



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LAS FUNCIONES DEL TGF-BETA EN EL DESARROLLO DE LA EXTREMIDAD

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JORGE RICARDO GARCIA GARCIA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESUS CHIMAL MONROY



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

0349799



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Evaluación de las funciones del TGF beta en el desarrollo de la extremidad".

realizado por **Jorge Ricardo García García.**

con número de cuenta **09212937-3**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
Propietario

Dr. Jesús Chimal Monroy.

Propietario

Dra. Diana Escalante Alcalde.

Propietario

Dr. Iván Velasco Velázquez.

Suplente

Dra. Rosa Estela Navarro González.

Suplente

Dr. David Garcíadiego Cázares.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. **Juan Manuel Rodríguez Chávez**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos.

El presente trabajo se realizó con el financiamiento a los proyectos 34334-N y 42568-Q auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y con el apoyo a los proyectos IN200205 y IN218104 de la DGAPA, UNAM.

Agradezco a la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda y a Minerva Rodríguez Castro el apoyo técnico durante la realización del trabajo experimental de dicho proyecto y a Lucia Brito por el apoyo en la biblioteca.

Agradezco en especial al Dr. Jesús Chimal Monroy por prestar las facilidades para el trabajo experimental dentro de su laboratorio, sus constantes recomendaciones y apoyo en general. A los miembros del jurado Dra. Diana Escalante Alcalde, Dr. David Garciadiego Cázares, Dr. Iván Velasco Velázquez, Dra. Rosa Estela Navarro González y Dr. Jesús Chimal Monroy por las revisiones a este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatorias.

A todos aquellos hombres y mujeres que han hecho alguna aportación en beneficio de la humanidad.

A mis padres por su ayuda y por haberme fomentado desde niño mi profundo amor por el conocimiento

A mis hermanos por su apoyo y convivencia diaria

A Gerardo por ayudarme con mi tesis.

A mi madre Hortensia García por sus atenciones diarias

A la vida por haberme reconciliado con mis padres y por aceptarlos tal como son.

A mis maestros que me acercaron al conocimiento.

A mis profesores de secundaria, a mis maestros de biología del CCH y de la facultad.

Al CCH por haber desarrollado mi capacidad crítica y analítica, a mis compañeros de laboratorio por su ayuda, sus recomendaciones y comentarios críticos a este trabajo.

(Gracias a, David Cruz, Alberto, David Garciadiego, Emeli, Georgina, Karina, Karla, Marco, René y Sinué,).

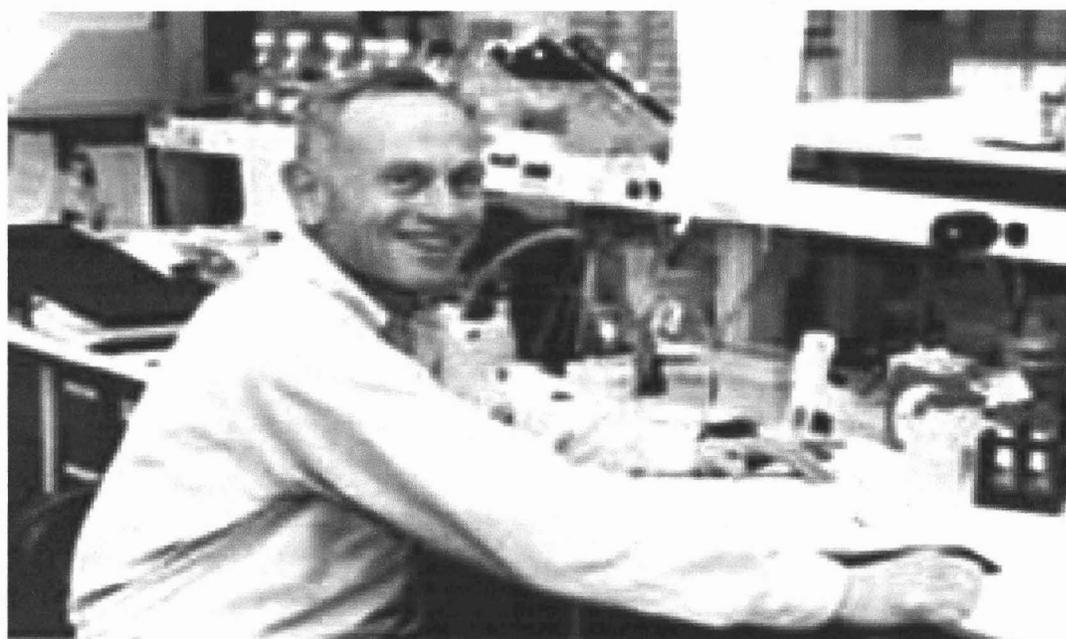
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Imagen de la estructura cristalina de TGF β 3 por Mittl et al, 1996 en Shi y Massagué, 2003.

En la era de la embriología clásica ya se conocían los factores de crecimiento, pero es en la era de la Biología Molecular que actualmente vive la biología del desarrollo que cobraron relevancia por caracterizarse e involucrarse en la inducción de numerosos órganos.

Gilbert, 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



En la imagen que se muestra (arriba), la fotografía de la Dra. Anita Roberts la cual trabaja en el laboratorio de Quimioprevención de la Universidad de Indiana. Mientras que en la fotografía de abajo la del Dr. Michael Sporn de la Escuela de Medicina Dartmouth en Hanover, New Hampshire. Ambos fueron descubridores del $TGF\beta$ en 1982.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A todos aquellos autores que han generado los conocimientos que sirvieron de base para desarrollar este trabajo.

A esta gran institución, la UNAM por enseñarme a ser y a aprender a aprender.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

“Antes hubo seres que intentaron el progreso del hombre por la fuerza del pensamiento pero en vez de gloria, alcanzaron crueles castigos, en razón a que se suponía que los dioses veían con envidia a aquellos inventores que usurpaban algo de su poder con sus creaciones independientes... Prometeo fue el mas famoso de aquellos genios benéficos. Pertenecía a la gran raza de titanes que se rebeló contra los dioses, aunque mas cuerdo que sus hermanos, no tomó parte alguna en aquella lucha de orgullo sin duda porque veía el desenlace de la guerra... Ni titanes ni dioses pensaban en los hombres y cuando Zeus rey del Olimpo, salió vencedor quiso destruir a los inocentes mortales con sus enemigos a tal punto que llegó la embriaguéz de su victoria. Prometeo los salvó y no se contentó sino que aspiró a sacarles de la condición de animales en que vivían, para lo cual robó el fuego del cielo y les enseñó a bosquejar las primeras artes con aquella especie de alma de la materia. Zeus se indignó, porque no quería la prosperidad del hombre, sino que como amo celoso, deseaba esclavos incapacitados de elevarse. No se atrevió o no pudo quitar a los mortales el fuego, cuya conservación cuidaban todos: pero castigó a Prometeo atándole con cadenas en un monte, no lejos del Cáucaso, entre Europa y Asia para que el mundo entero viese el castigo, y dejándole a merced de un buitre que noche y día devoraba su hígado que renacía eternamente”

Leyenda de Prometeo de Esquilo narrada por Esiodo.



ÍNDICE

Lista de abreviaturas	2
Resumen	3
1. Antecedentes	5
1.1 El factor de crecimiento transformante tipo beta	6
1.1.1 Co-receptores de TGF- β	9
1.1.2 El betaglicano	10
1.1.3 La endogлина	11
1.2 Inducción del primordio de la extremidad	11
1.2.1 El modelo de la zona de progrezo	16
1.2.2 El modelo de la preespecificación	18
1.2.3 Confrontación de los modelos: Zona de Progreso y Preespecificación	18
1.3 Formación del eje anteroposterior	19
1.4 Especificación del eje dorso-ventral	24
1.5 Interacción entre los diferentes centros de señalización.	26
1.6 La identidad de los dedos y señales moleculares que la determinan	27
1.7 Condrogénesis y osificación de la extremidad en estado embrionario	30
1.8 Eventos en la formación de las articulaciones y genes participantes	32
1.9 Mecanismos celulares y señales moleculares que participan en el desarrollo del tendón	37
1.9.1 El sindetomo: La capa somítica que origina a los tendones	42
1.9.2 Aproximaciones clásicas al estudio del desarrollo del tendón	42
1.9.3 Genes involucrados en el desarrollo del tendón	43
1.9.4 La regulación de distintos marcadores asociados con el tendón	44
2. Planteamiento del problema	46
3. Objetivos	47
4. Hipótesis	48
5. Métodos	49
5.2 Histología, Técnica de Metenamina-Plata	49
5.3 Preparación de laminillas con TESPA	51
5.4 Hibridaciones In Situ en "Whole Mount"	51
5.5 Electroporación como técnica de transfección	53
6. Resultados	55
6.1 Patrones de expresión de TGF β , Alk5, Smad3 y Betaglicano	55
6.2 TGF β induce acortamiento de la extremidad y cambios en la identidad de los dedos	58
6.3 El bloqueo de la función de TGF β en la región anterior de la extremidad genera la pérdida de dedos y cambio de identidad	59
6.4 La señalización de TGF β es importante para el desarrollo del tendón	62
7. Discusión	64
8. Conclusiones	67
9. Perspectivas	68
I. Apéndice	69
I.1 Preparación de la ribosonda	69
I.2 Tinción de esqueleto (Hueso y cartílago)	70
I.3 Detección de muerte celular con la tinción de rojo neutro	71
I.4 Preparación de perlas de heparina	71
II. Soluciones	72
Referencias	78

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Lista de abreviaturas.

- AER= Cresta ectodérmica apical.
ALK= Cinasa de activinas.
BMP= Proteína morfogenética del hueso.
CO-SMAD= Smad cooperadoras.
CD= Displasia campomélica.
EN1= Engrailed.
Eph-A4= Efrina.
FACID= Colágena asociada a las fibrillas triple helice.
FGF= Factor de crecimiento de los fibroblastos.
GDF= Factor de crecimiento y diferenciación.
IHH= Indian hedgehog.
I-Smad= Smad inhibidora.
MEC= Matriz extra-celular.
PTC= Patched.
R-Smad= Smad reguladora.
SHH=Sonic hedgehog.
SMO= Smoothened.
TGF β = Factor de crecimiento transformante beta.
WNT= Wingles int related.
ZPA= Zona de actividad polarizante.

Resumen.

En este trabajo se evaluó el papel del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en la formación de los elementos esqueléticos de la extremidad del pollo (*Gallus gallus*), así como su relación con la identidad de los dedos, la formación de las articulaciones y tendones y la muerte digital e interdigital. Para dichos fines se compararon los patrones de expresión TGF β 2, Alk5, Smad3 y Beta-glicano con el fin de hacer una correlación con la función de TGF β en la extremidad. Para comprobar la participación del TGF β se hicieron experimentos de pérdida de función de esta última molécula con la electroporación del dominante negativo de Smad3 (Smad3 Δ). Después de los experimentos de ganancia de función ocurre un acortamiento tanto del autómodo como del zeugópodo debido a la inhibición de la maduración y proliferación de los condrocitos después de colocar una perla con TGF β en la parte central del autómodo mientras que al colocarla en la parte posterior hay una transformación de los dedos posteriores en anteriores.

Los experimentos de pérdida de función muestran fenotipos variados desde la disminución en el tamaño o pérdida de los elementos esqueléticos, pérdida de la identidad digital y articulaciones fusionadas. En lo que respecta a la formación del tendón la extremidad al ser tratada con β -glicano no forma el tendón, por lo que se sugiere que existe una participación de la señalización de TGF β en el desarrollo de este tejido

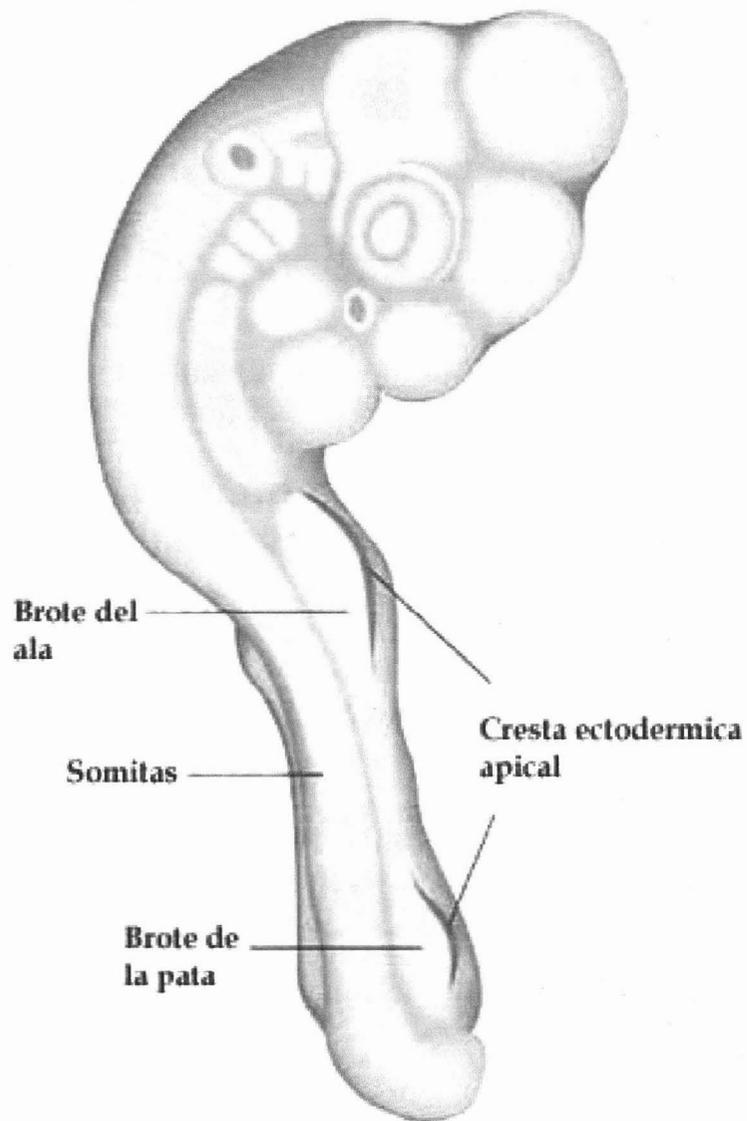


Figura 1 .- El modelo del presente trabajo: el embrión de pollo y sus extremidades presuntivas. Brote del ala y brote de la pata. (Wolpert et al, 2002).

1. Antecedentes.

Las extremidades de los vertebrados presentan una organización tridimensional a través de tres ejes anatómicos. Estos tres ejes son: el próximo-distal, el antero-posterior y el dorso-ventral. Si ponemos a nuestras extremidades como ejemplo, en el eje próximo-distal la parte más proximal es la cercana a los hombros, mientras que la parte más distal la constituyen los dedos. En el eje antero-posterior, la parte más anterior es la representada por los pulgares mientras que la más posterior se representa por los dedos meñiques (en manos o pies) En el eje dorso-ventral la parte dorsal se representa con los nudillos mientras que la ventral por la palma de nuestras manos.

Desde un punto de vista anatómico, las extremidades se dividen en tres regiones que son el estilópodo, representado por el húmero para las extremidades anteriores y un fémur para las posteriores. El zeugópodo formado por el radio y la ulna para las extremidades anteriores mientras que una tibia y fibula para las posteriores. Por último los metatarsales /metacarpales y las falanges constituyen el autópedo (Fig 2).

De manera general, las moléculas involucradas en el establecimiento de estos ejes en las extremidades son: los factores de crecimiento de los fibroblastos (*Fgf*) para la polaridad próximo-distal; Sonic hedgehog (*Shh*) para la antero-posterior, y *Wnt7a* para la dorso-ventral (Gilbert, 2003).

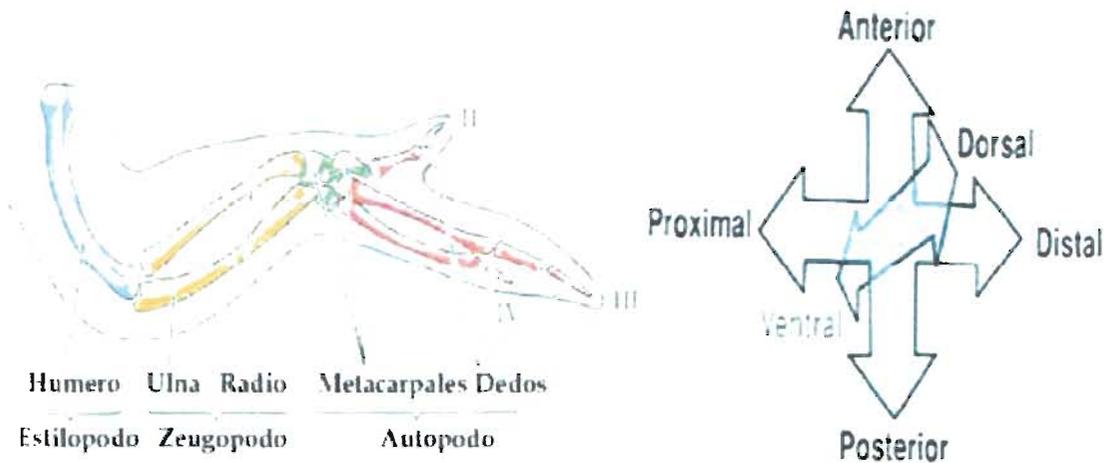


Figura 2.- Patrón esquelético del ala de pollo y ejes de simetría en los que se estudia. Los dedos del ala se numeran del II al IV. (Gilbert, 2003; Woipert et al, 2002)

Antes de continuar describiendo el desarrollo de la extremidad se explicará que es el Factor de Crecimiento Transformante tipo Beta ($TGF\beta$ por sus iniciales en ingles), de que manera se une a sus receptores y cómo se transduce esta señal.

1.1 El factor de crecimiento transformante tipo beta

Los factores de crecimiento o también llamados factores parácrinos actúan sobre una célula vecina para ejecutar su acción, uno de ellos es el $TGF\beta$. La superfamilia del $TGF\beta$ incluye a cerca de 30 miembros estructuralmente relacionados, los cuales regulan algunos de las más importantes interacciones en el desarrollo, como lo son: la proliferación celular, la determinación del linaje, la diferenciación, la movilidad, la adhesión y la muerte celular. La superfamilia de $TGF-\beta$ incluye a la familia de $TGF-\beta$, la familia de las activinas, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), la familia Vg1 y otras proteínas (Gilbert, 2003; Massagué, 1998) (Fig3).

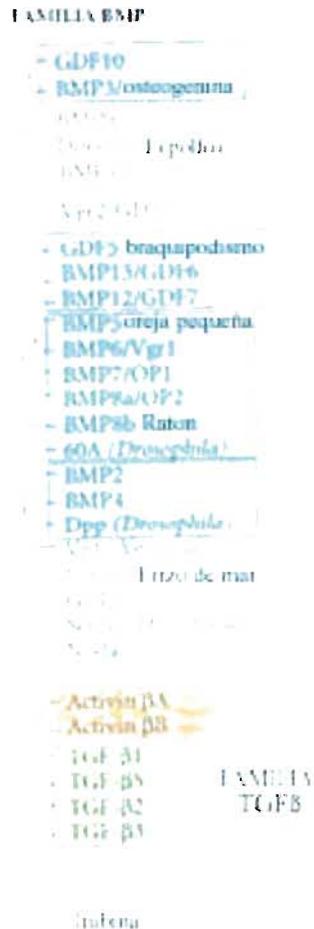


Figura 3 - Diferentes miembros de la superfamilia de TGFβ y sus relaciones de semejanza. Se agrupa a los miembros de las familias BMP (azul) y TGF (café) (Hogan 1996; en Gilbert, 2003).

La familia TGF-β incluye al TGFβ1, 2, 3, 4 y 5 (Gilbert, 2003), el TGFβ1 fue el primer factor de esta familia identificado y aislado (Sporn y Roberts,1992) de plaquetas y placenta humanas, así como de riñón bovino. En 1984 fue clonado y después se encontraron cuatro isoformas en vertebrados, tres de las cuales se encuentran en el humano (TGFβ 1, 2 y 3). En 1983 se caracterizó bioquímicamente y se demostró que era un factor que induce el crecimiento celular en placas de agar (revisado en Roberts et al, 2003).

El TGF- β 1 es un homodímero de 25 KDa (Sporn y Roberts 1990, 1992). El TGF β 2, una segunda molécula emparentada se aisló de hueso bovino, de células de glioblastoma humanas, de plaquetas porcinas y mostró tener una secuencia de aminoácidos diferente al TGF- β 1. Los TGF- β son homodímeros pero tienen potencial para formar heterodímeros. Es un factor de crecimiento peptídico cuya acción solo puede ser considerada en un contexto celular (Sporn y Roberts 1990). Por ejemplo, en células mesenquimáticas de embriones de rata, el TGF β induce condrogénesis. Sin embargo, en células de cartílago ya diferenciadas el TGF- β inhibe la maduración de éste (ibidem).

El TGF- β se une al receptor tipo II de TGF- β el cual permite que éste se una al receptor tipo I o también llamado Alk5 (Activin Receptor Like Kinasa) también en algunos tipos celulares como en células endoteliales y en el desorden hereditario telangiectasia hemorrágica se expresa otro tipo de receptor I, Alk1. Una vez que los dos receptores están en contacto cercano, el receptor tipo II fosforila en sitios de serina/treonina del receptor tipo I, e induce un cambio conformacional, activándolo. El cambio conformacional en el dominio citoplasmático da lugar a una actividad enzimática y normalmente activa su propiedad de cinasa que usa ATP (Fig. 4).

Una vez activado el receptor tipo I, éste puede ahora fosforilar a las proteínas SMAD (Yigong y Massagué, 2003; Massagué, 1998). Las SMAD son factores de transcripción, cuyo nombre proviene de los primeros miembros identificados de esta familia en *Caenorhabditis elegans* por las proteínas SMA y en *Drosophila* la proteína MAD. Las SMAD son 8 proteínas que se agrupan en 3 clases. Las R-SMAD (smad reguladoras por receptor), las cooperadoras (CO-SMAD) y las SMAD inhibitoras (I-SMAD). Las R-SMAD asociadas a la señalización del TGF β son las Smad2 y Smad3 que son directamente fosforiladas y activadas por el receptor cinasa y experimentan homotrimerización y formación de un complejo heteromérico con la SMAD (SMAD 4) (Gilbert,

TRONCO CON
FALLA DE ORIGEN

2003).

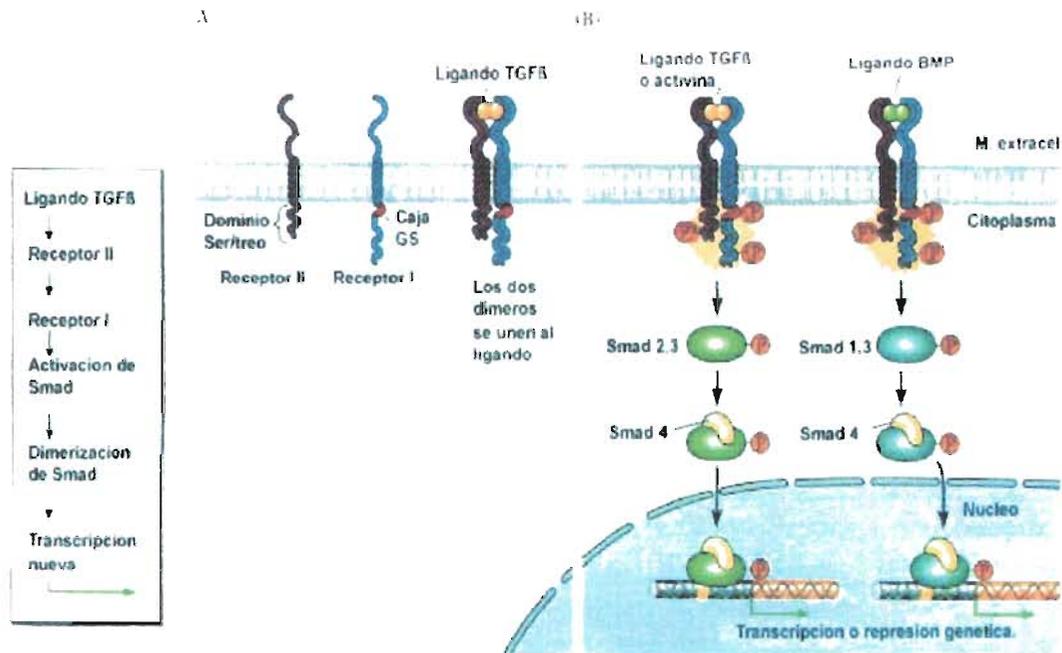


Figura 4.- Mecanismo de transducción de señales del TGF por medio de las Smad. Los receptores I y II se acercan al contacto con TGFβ –su ligando-(A). Una vez que los receptores están en contacto cercano, el receptor tipo II se fosforila en los sitios serina/treonina del receptor tipo I y lo activa. El receptor activo puede catalizar reacciones que activan los factores de transcripción (Smad 2,3 para TGFβ) que a su vez reprimen o activan un grupo particular de genes (Gilbert, 2003)

Las I-SMAD, (SMAD 6 y SMAD 7) regulan negativamente la señal de los miembros de la superfamilia del TGFβ. Para el caso del TGFβ, la *Smad7* inhibe la señalización dependiente de TGF-β/activinas al evitar la interacción entre las *Smad2* y *3* con la *Smad 4* (Shi y Massagué, 2003). Como mencionamos anteriormente SMAD es un factor de transcripción esto quiere decir que el dominio MH1 de las Smad contiene una región hélice vuelta hélice H2 localizada cerca del motivo β-hairpin de unión a DNA que reconoce a la secuencia CAGA en los genes blanco (Shi y Massagué, 2003).

1.1.2 Co-receptores de TGF β.

El receptor tipo III para TGFβ llamado co-receptor presenta dos iso-formas la forma soluble y la anclada a la membrana. La forma soluble, no permite la

transducción de la señal inducida por TGF β y por lo tanto por su actividad antagónica modula el acceso del ligando a los receptores tipo I y II. Pero cuando está en la membrana facilita el acceso del ligando con su receptor. Los co-receptores de TGF β son el betaglicano y la endogлина (Vilchis-Landeros, 2002).

1.1.3 El betaglicano.

El betaglicano es un proteoglicano transmembranal con cadenas de glicosaminoglicanos, tiene gran capacidad para unirse al TGF β (Massagué, 1990), en particular al TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 (Sagarini et al, 1987; Cheifetz y Massagué, 1991). Este co-receptor facilita la unión de TGF β al receptor II, formando el complejo betaglicano/TGF β /receptor II y con esto potencia su acción (López-Casillas et al, 1993). Esta potenciación de TGF β es más evidente en la isoforma TGF β 2 que en TGF β 1 en células progenitoras hematopoyéticas (Otha et al, 1989), mioblastos (López-Casillas et al, 1993) y células endoteliales (Cheifetz y Massagué, 1991) que no tienen betaglicano. La transfección de betaglicano en estas células aumenta la unión de TGF β 2 (López-Casillas, 1993). El dominio extracelular de betaglicano tiene dos sitios de unión al TGF β , uno en la región similar a uromodulina y otro en la región similar a la endogлина (Pepin et al, 1994). La enzima plasmina corta estos sitios de unión al TGF β y genera los dos dominios separados físicamente. La región semejante a la uromodulina del betaglicano se une preferencialmente a la *Inhibina A*, que es un factor perteneciente a la familia del TGF β , cuya función es inhibir a la *Activina*.

Se sabe que el betaglicano puede encontrarse o bien unido a la membrana plasmática o bien en forma soluble. Esta molécula, al encontrarse unida a la membrana incrementa la unión del TGF β al receptor tipo II, mientras que cuando está en forma soluble secuestra al TGF β evitando que este factor se una a su receptor. La liberación puede deberse a la presencia de un sitio de corte proteolítico particularmente en los sitios lisina-lisina antes de la región transmembranal o a la presencia de una secuencia específica de aminoácidos

(López-Casillas et al, 1991). Se desconoce el mecanismo por el cual ocurre este proceso.

1.1.4 La endoglina.

La endoglina es otro co-receptor que se expresa en alta concentración principalmente en la superficie de células endoteliales y en monocitos, precursores eritroides y otros tipos celulares en menor concentración (Gaugos y Latarte, 1990). La endoglina une a TGF β 1 y TGF β 3 pero no a TGF β 2. Se han caracterizado dos isoformas de la endoglina: la L-endoglina y la S-endoglina. El betaglicano y la L-endoglina comparten una región con alta identidad de residuos de serina y treonina (López-Casillas et al, 1991; Gougos y Letarte, 1990; Wang et al 1991). Se ha observado la asociación entre la endoglina y los receptores del TGF β pero su participación en la señalización no está clara. Aunque se lleva a cabo la unión del TGF β por la endoglina, es limitado si se compara con el betaglicano y se incrementa cuando se co-expresa el receptor tipo II de TGF β .

1.2 Inducción del primordio de la extremidad

El desarrollo de la extremidad ocurre en el flanco del embrión de pollo entre las somitas 12-15 para las extremidades anteriores y 27-28 en las posteriores, forman los llamados campos embrionarios de la prospectiva extremidad (Searls and Janners, 1971). El mesodermo intermedio emite señales hacia la placa lateral del mesodermo, las células de ésta proliferan y ahora son éstas las que interactúan con el ectodermo del campo embrionario que dará origen a la extremidad. Esto tiene como consecuencia la formación del primordio de la extremidad. Las células de la placa lateral del mesodermo darán origen a los precursores esqueléticos, mientras que las células de la región del miotomo en las somitas son las precursoras del músculo de la extremidad.

Las señales provenientes del mesodermo intermedio, se han considerado como las inductoras de las extremidades, como lo demuestran los experimentos en los que se colocaron barreras de aluminio en los tejidos del mesodermo intermedio (Fernandez-Terán et al, 1997). Ahora sabemos que una de estas señales es el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8). Esta señal actúa sobre las células del mesodermo de la placa lateral del mesodermo, que más tarde se convertirán en el mesénquima prospectivo de la extremidad e inician la expresión de FGF10, el cual es capaz de iniciar la interacción entre el mesodermo y el ectodermo. Aquí el ectodermo, en respuesta al *Fgf10*, inicia la expresión de *Fgf8* (Gilbert, 2003) (Fig. 5).

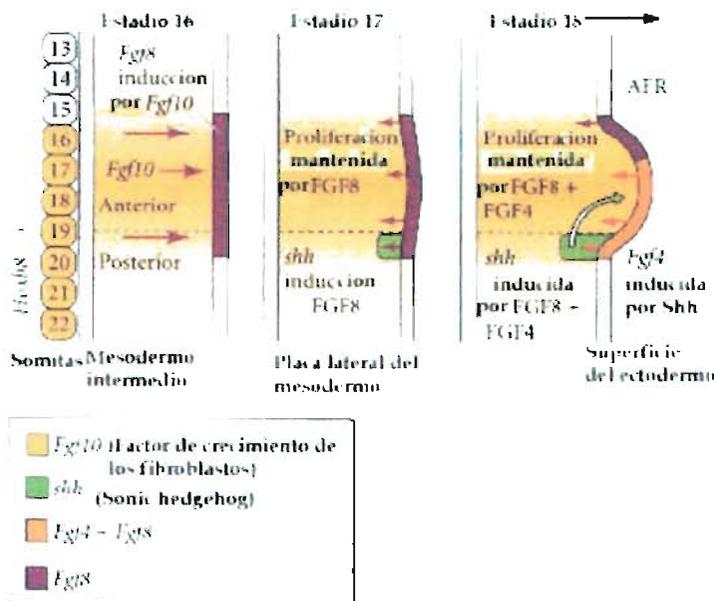


Figura 5.- Modelo de la inducción temprana de la extremidad. FGF8 secretado por el mesodermo intermedio induce la expresión de FGF10 en el ectodermo competente a nivel de la frontera dorso-ventral. La expresión de FGF8 induce la proliferación de Sonic hedgehog, esta última molécula induce la expresión de FGF4 en la porción posterior de la extremidad (Gilbert, 2000).

Experimentos en embriones de pollo demuestran que cualquier miembro de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico es capaz de inducir extremidades ectópicas en el flanco del embrión. En estos experimentos, la

extremidad generada será ala o pata dependiendo de la posición (más cercana al

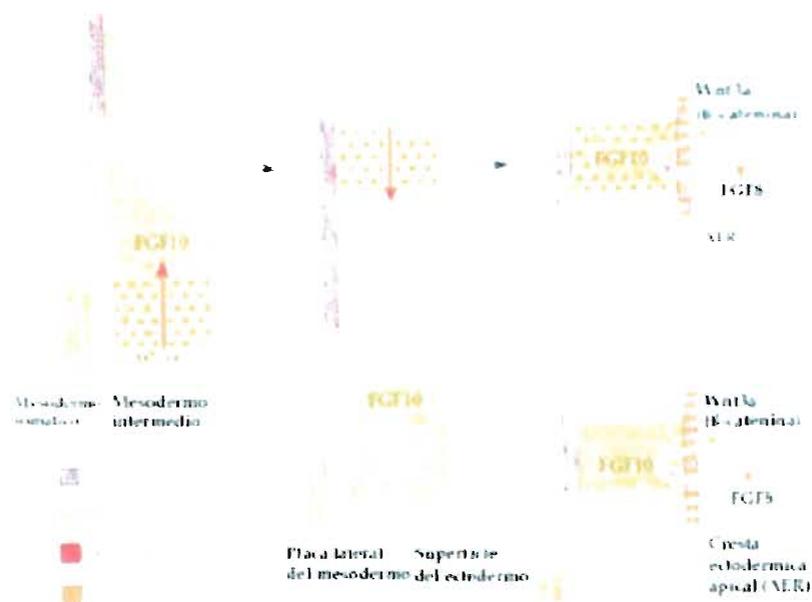


Figura 6.- Modelo de iniciación del desarrollo de la extremidad entre las 48 y 54 horas de incubación. Se observa (A) que la expresión de FGF10 se presenta en la placa lateral del mesodermo y esta señal es reprimida por la expresión de Wnt 8, en el área donde se forman las extremidades posteriores (B). La expresión de FGF 10 es estabilizada por la expresión de Wnt2b en la región donde se forman las extremidades anteriores (C). FGF10 presente tanto en la región anterior como en la posterior de las extremidades presuntivas de la placa lateral del mesodermo es inducida por FGF8 en la AER. Esta inducción está relacionada con la vía que involucra Wnt3a en el ectodermo. También FGF8 secretada por la AER induce la expresión mesodérmica continuada de FGF10. La participación de FGF8 en el mesodermo intermedio (IM) en el mantenimiento de la expresión de Wnt es incierto (SM= mesodermo somático; SE= Superficie del ectodermo) (Gilbert 2003).

ala o a la pata) en la que se colocan las proteínas, lo que sugiere que deben haber otras señales que dirijan el desarrollo de las extremidades (Ohuchi et al, 1998;

Logan et al, 1998; Takeuchi,1999; Rodríguez-Esteban et al, 1999). Los miembros de la familia de los T-box (*Tbx*) dirigen el destino final de estas estructuras: el gen *Tbx4* induce la formación de las patas, mientras *Tbx5* el de las alas (Gibson-Brown et al,1996).

Adicionalmente, otras moléculas, de la familia de los genes *Wingless-int* related proteins (Wnt), se expresan de manera específica en el ala (Wnt2b) y el Wnt8c en la pata (Kawakami et al, 2001)(Fig 6).

El crecimiento de las extremidades en sentido próximo-distal, es posible por la interacción del mesénquima (parte mesodérmica) y la cresta ectodérmica apical (AER por sus iniciales en inglés) que constituye la parte ectodérmica (Zwilling et al, 1955; Saunders, 1957; Saunders, 1972; Krabenhof y Fallon, 1989). La AER es una estructura formada por un epitelio pseudo estratificado que recorre el borde distal del primordio de la extremidad (Saunders, 1957). Esta estructura es indispensable para la formación de zonas distales. Con el fin de demostrar la función de la AER, Saunders et al (1948) la quitaron en una etapa temprana del brote de la extremidad, en dicho experimento se observó la inhibición del desarrollo, de la formación de las estructuras más proximales (Figura 7).



Figura 7 Resultado de retirar la AER a diferentes estadios del desarrollo proximo-distal de la extremidad. En etapas tempranas de la renoucion de la AER, no se forman las partes proximales de la extremidad en el embrión de pollo. Kalthoff, 2001

Además, al transplantar un explante de AER extra a la ya existente se duplicó la parte distal del ala (Saunders et al, 1948). Estos experimentos sugieren la existencia de señales presentes en la AER que están involucradas en el crecimiento próximo-distal de la extremidad. Se han realizado otros experimentos en los que se cambia el mesénquima de la extremidad por mesénquima que no es de extremidad, mientras que el ectodermo se deja intacto y como se observó que el desarrollo se detuvo se concluye que el mesodermo también genera señales moleculares que permiten el crecimiento de las partes distales de la extremidad (Summerbell y Lewis, 1975). Así tenemos que el *Fgf10* expresado en el mesénquima del primordio, induce a las células ectodérmicas a que formen la cresta ectodérmica apical (Xu et al, 1998; Yonei- Tamura et al, 1999; Crossler et al, 1996). En un último experimento en el que se reemplaza la AER por una perla

embebida en FGF (al parecer no importa que tipo de FGF se utilice), se comprueba que esta molécula es una condición necesaria para el crecimiento próximo-distal, ya que el desarrollo de la extremidad continúa hasta que se forman las tres piezas esqueléticas. El *Fgf8* es la principal molécula liberada por la AER y que controla el crecimiento próximo-distal. Se sugiere que el FGF8 actúa sobre un grupo de células subyacente a la AER, promoviendo su proliferación (Mahmood, 1995; Crossley et al, 1996; Vogel et al, 1996; Ohuchi et al, 1997). Hay que tener en cuenta que al mismo tiempo que está ocurriendo la elongación de la extremidad, ocurre el establecimiento de los elementos esqueléticos. Actualmente existen dos modelos para explicar la coordinación entre estos dos procesos.

El más antiguo, propuesto por Lewis Wolpert es el de la zona de progreso (PZ) y el más reciente, propuesto por Gail Martin y Cliff Tabin, se denomina pre-especificación (Summerbell et al, 1973; Gilbert, 2003).

1.2.1 El Modelo de la Zona de Progreso (PZ).

El modelo de la zona de progreso postula que existe una región de células de mesénquima con actividad proliferativa por debajo de la AER la cual se denomina zona de progreso (PZ). Esta región se extiende por alrededor de 200 μm por debajo de la AER (Rowe y Fallon, 1982) y se mantiene al parecer por acción de los FGF. Este modelo postula que cada célula mesenquimática se especifica en función del tiempo que permanece en esta zona durante la proliferación. Una vez que el primer grupo de células disminuye su actividad proliferativa sale de la zona de progreso, y formará al elemento esquelético del estilópodo. Estas células serán desplazadas por las nuevas células que están en esta zona y que serán especificadas a formar el zeugópodo. Finalmente el siguiente grupo por diferenciarse se desplazará hacia la región más proximal, formando el autópedo. De esta manera, las primeras células que salgan de la zona de progreso formarán el estilópodo y las últimas el autópedo (Fig. 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este modelo explica por qué, al remover la AER, sólo se forman estructuras proximales. Al quitar la AER, se eliminan o disminuyen los factores que inducen a las células de la zona de progreso a proliferar y, más tarde, a especificarse.

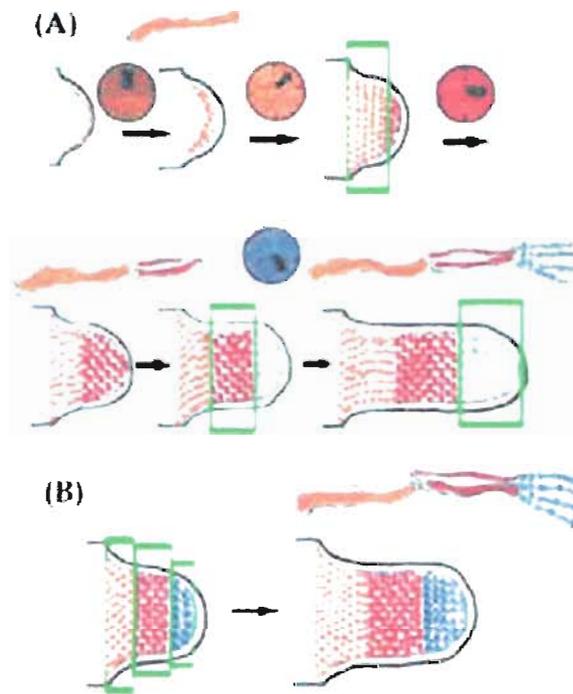


Figura 8- Modelos de crecimiento del mesodermo por debajo de la AER. Zona de progreso y la Preepecificación. En la figura A se muestra la división de las células de la zona de progreso (DZ) en este y una caratula de reloj tambien en este. El reloj no indica el tiempo real sino que representa el avance en el tiempo. Después se muestra el cambio de color en el punto y en la caratula lo que indica que después de la progresion en el tiempo ocurre especificación (representada en el cuadro verde). La region más proximal especificada de color naranja representa el estilopodo, la roja al zeugopodo y la violeta al antopodo. El color de la caratula es el mismo que el que se encuentra en la zona de progreso o que ha sido especificada resaltando la dimension temporal. En la figura B se observa la representación del modelo de la preepecificación en este ocurre una especificación temprana y después solo ocurre mitosis. Experimentos de retiro de la AER a diferentes estadios indica la formación de alguna de las tres regiones de la extremidad siendo las más proximales las primeras que se forman.

1.2.2 El Modelo de la Preespecificación.

Gail Martin y Cliff Tabin (Dudley et al 2002; Sun et al 2002) propusieron el modelo de expansión progenitora como una alternativa a la zona de progreso. En este modelo, las células ya están especificadas y simplemente ocurren mitosis que expanden estas poblaciones celulares (Fig. 11).

Al teñir células de la zona de progreso de embriones de pollo en estadio 19 se observa que células del autómodo presentan marca. En esta etapa de desarrollo no se evidencia aún la formación del autómodo, por lo que resulta interesante que el autómodo se encuentra marcado cuando la zona de progreso se tiñe. Si de acuerdo a Wolpert el mayor tiempo de permanencia en la zona de progreso determina la formación del autómodo y se tiñe solo un segmento, se concluye por lo tanto, que ocurre una especificación temprana y que el tiempo invertido en la zona de progreso no especifica la posición celular.

En ratones knockout para *fgf 4* y *Fgf8*, (moléculas expresadas en la AER) resulta pérdida de las regiones distales, mientras que las proximales se mantuvieron. Esto último no se puede explicar con el modelo de la zona de progreso el cual depende del tiempo de permanencia de las células mitóticas en esta región (Sun et al, 2002).

1.2.3 Confrontación de los modelos: Zona de Progreso y Preespecificación.

El modelo de la zona de progreso se explica porque al remover tempranamente la AER, solo se forman estructuras proximales (Saunders, 1948) puesto que al quitar tempranamente la AER, la especificación no ocurre. También puede observarse que si se quita la AER poco más tarde en el desarrollo se forman el húmero, el radio y la ulna (Summerbell, 1974; Saunders, 1948; Iten, 1982; Rowe y Fallon, 1982). Al parecer, la AER da información posicional a las células en proliferación que forman las estructuras dependiendo de la posición donde se encuentre a lo largo del eje proximo –distal.

Cuando en el embrión de pollo la AER (24HH) en etapas avanzadas se transplanta con mesodermo joven (19/20HH), como resultado se producen delecciones en la parte media y cuando la cresta ectodérmica joven (19/20HH) se combina con mesodermo viejo (24HH), se producen duplicaciones de estructuras, se estará haciendo referencia a la información posicional que la cresta ectodérmica dé a las células por especificarse. Además, cuando la zona de progreso de un embrión es puesta en el brote de la extremidad en estadios tardíos, se producen nuevas estructuras proximales además de las ya presentes (Summerbell y Lewis, 1975).

1.3 Formación del eje antero-posterior.

Un grupo de células mesodérmicas situadas cerca de la unión posterior del brote de la extremidad joven y la pared corporal, se conoce como zona de actividad polarizante (ZPA). Esta región mesodérmica cuando se transplanta en la región anterior, produce un conjunto adicional de dedos en imagen especular del patrón normal (Fig 9).

Tabin y colaboradores (1993) identificaron por hibridación in situ (Fig. 10), que el gen *Sonic hedgehog* (*Shh*), se expresa en la ZPA. La transfección de fibroblastos embrionarios de pollo con un vector viral que codifica para el gen *Shh* y la implantación de estas células bajo el ectodermo anterior de un brote de ala joven, resultó en una duplicación de los dedos en imagen especular similar al trasplante de la ZPA hacia la parte anterior (Riddle et al, 1993). (Fig. 11).

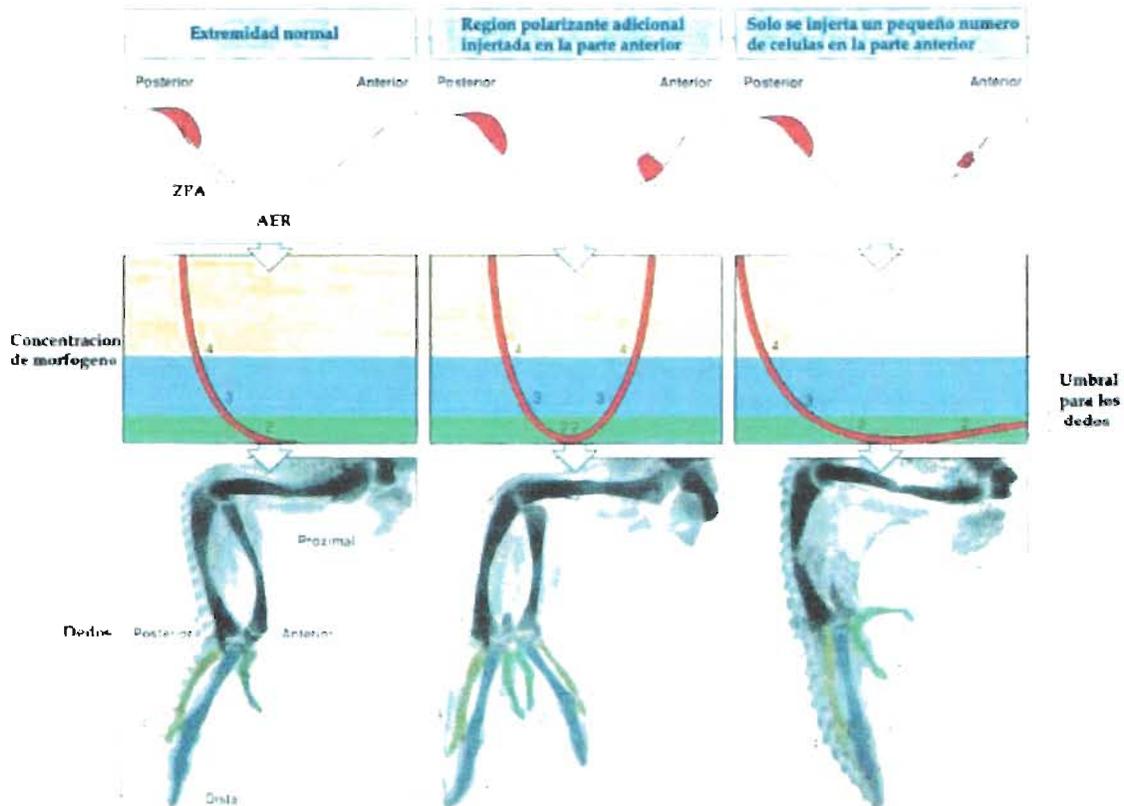


Figura 9.- La ZPA especifica la polaridad antero-posterior. Al injertar una sección adicional a la región polarizante al margen anterior de una extremidad puede resultar en una señal en gradiente y que genera una imagen especular. Se observa que la figura de la derecha muestra la atenuación de la señal por el injerto de solamente un pequeño número de células de la ZPA al margen anterior del brote de la extremidad de manera que se forma solamente un dedo 2 adicional. Los números representan el tipo de dedo del ala, mientras que los colores representan el dedo que se forma dependiendo del gradiente de shh (Wolpert, 2002)



Figura 10.- La región posterior de la extremidad es la zona de expresión de Sonic hedgehog (se muestra hibridación in situ), por lo cual se concluye que la expresión de Shh correlaciona con la zona de actividad polarizante (ZPA). Tamaño de la medida=0.1mm (fotografía de C. Tabin en Wolpert, 2002).

Experimentos posteriores indicaron que al poner una perla embebida en la proteína SHH, se produjeron las mismas duplicaciones en un ala de pollo (López-Martínez, 1995). De esta manera, se demuestra que *Shh* es la molécula implicada en la actividad polarizante de la parte posterior de las extremidades.

Esta última molécula sigue una complicada vía a través de Patched y Smoothened, dos receptores de membrana. En ausencia de SHH, Smo está inhibida por Patched. Cuando Smoothened no presenta el ligando (*Shh*) esta vía se inhibe por Patched, en cambio cuando SHH se une a Patched libera a Smoothened y se inicia una vía que lleva a la expresión del factor de transcripción *Gli1* (Mileckovic et al 1999).

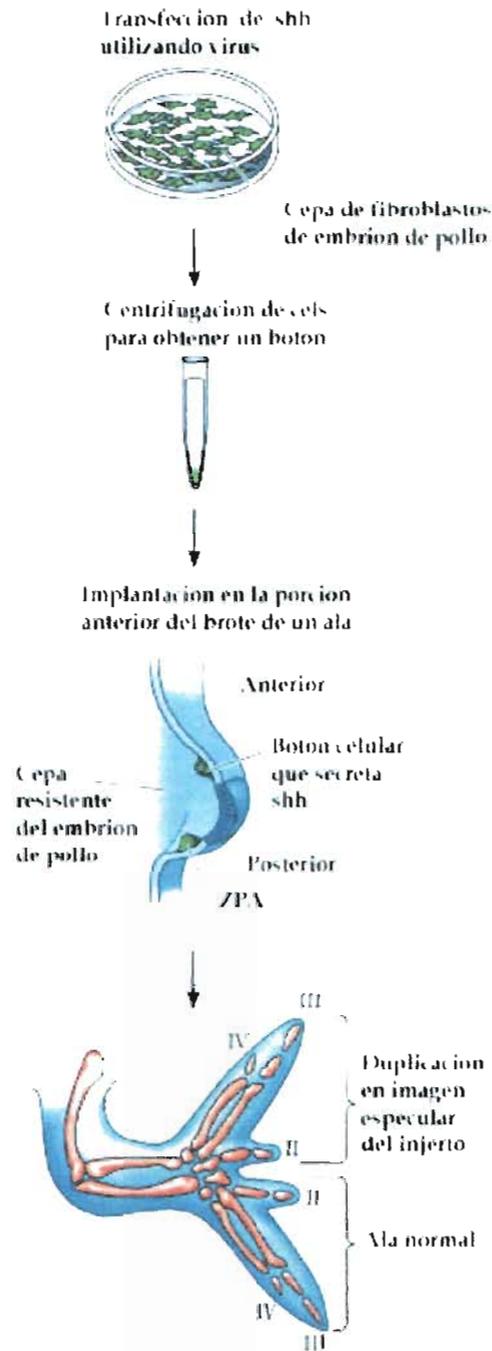


Figura 11.- Transfección viral de Sonic hedgehog de fibroblastos de pollo y su posterior trasplante en la parte anterior de la extremidad generan duplicaciones del autópodo en imagen especular. Esto demuestra que la proteína secretada Shh tiene actividad polarizante. (Riddle et al, 1993 en Gilbert, 2000).

El *Fgf8* secretado de la AER es capaz de activar a *Shh*. La ZPA y la AER mantienen un circuito genético que relaciona el crecimiento con el eje antero-posterior y próximo-distal. *Shh* induce la expresión de *Bmp-2*, (Laufer et al, 1994; Yang et al, 1997), la *Bmp2* presenta un dominio de expresión mayor que el de *Shh* (Francis-West et al, 1994).

Otros factores que también contribuyen a la restricción de la expresión de *Shh* a la zona posterior del primordio son *Gli3* y *Alx4*. Las mutaciones en los genes *Gli3* y *Alx 4* en ratones producen la generación ectópica de una zona polarizante por la expresión de *Shh* en la región anterior del esbozo de la extremidad, lo que determina la aparición de dedos supernumerarios en la pata (Litingtung et al, 2002; te Welscher et al, 2002) (Fig 18 G).

Anterior a la expresión de *Shh* se ha observado la presencia de dos factores de transcripción en la región posterior del brote temprano de la extremidad y con capacidad de inducir la expresión de *Shh*. Estos factores de transcripción son *Hoxb8* y *dHand*. Primero, en 1994 Charité y colaboradores sugirieron que la molécula que podía estar confiriendo una competencia entre células mesenquimatosas por debajo de la AER (las cuales estarían respondiendo a *Fgf8*) sería la proteína *HOXB8*, la cual cuando se expresa ectópicamente, tanto en el mesodermo anterior como en el posterior, induce la expresión de la proteína SHH creando dos ZPA s y una duplicación de los dedos en los miembros anteriores en imagen especular.

El segundo factor de transcripción relacionado con la respuesta de FGF en la AER es *dHand*, el cual se expresa en el mesodermo posterior y se expresa inmediatamente antes que *Shh*, induciendo su expresión. *dHand* pertenece a la familia de los factores bHLH. Incluso se han mutado ratones en *dHand* y como consecuencia *Shh* no se expresa (Charité et al 2000). Experimentos de sobre expresión de *dHand* en la región anterior de la extremidad en crecimiento, genera una segunda ZPA, por lo que se observa la duplicación de los dedos (Charité et al, 2000). Así también, esta sobreexpresión induce la activación de factores que actúan en su vía de señalización como *Gli*, *Ptc* y *Bmp-2*.

1.4 Especificación del eje dorso ventral

La región dorsal de las extremidades presenta nudillos, mientras que la ventral, cojinetes plantares; así también se presentan diferencias en la disposición de los músculos, tendones y otras estructuras.

Experimentos realizados por MacCabe (1974), muestran que al invertir el ectodermo en una rotación de 180° con respecto al mesénquima del brote de la extremidad, el eje dorso-ventral se invierte por lo que cambian de posición las estructuras dorsales hacia las ventrales y viceversa. Ésto sugiere la participación importante del ectodermo en el establecimiento del eje dorso-ventral.

Un gen candidato que regula esta polaridad es el gen *Wnt7a*. Este gen se expresa únicamente en la región dorsal de las extremidades de ratones y pollos (Dealy et al, 1993; Parr et al, 1993). Tal vez el experimento más relevante para relacionar a *Wnt7a* con el destino dorsal de las extremidades en formación, fue el realizado en 1995 por Parr y McMahon. Estos investigadores silenciaron (por mutación) el gen *Wnt7a* en ratón. El resultado fue la ventralización de las extremidades ya que los cojinetes plantares (ventrales) se observan en la región dorsal y ventral de las patas; mostrando de esta manera que *Wnt7a* es necesario para establecer el componente dorsal en las extremidades.

Otras moléculas involucradas en la especificación dorso-ventral, además de *Wnt7a*, son los factores de transcripción denominados Engrailed (*En1*) y *Lmx-1*. (Riddle et al, 1995; Vogel et al, 1995). La activación de *Wnt7a* induce la expresión *Lmx-1* en el mesénquima dorsal, este gen codifica para un factor de transcripción esencial para especificar el destino dorsal de la extremidad (Figura 12).



Figura 12.- Activación de la expresión de *Lmx-1* después de la expresión de *Wnt 7a* en el mesodermo dorsal. En contraparte a la expresión de *Lmx-1*, *engrailed-1* la reprime.

Los mutantes de *Lmx-1* en humanos y ratones presentan el mismo fenotipo en las extremidades que el presentado por la mutación de *Wnt7a* (Chen et al 1998; Dreyer et al 1998).

Por otra parte, los ratones mutantes para *En-1* desarrollan miembros con un patrón dorsalizado. Estos resultados sugieren que *En-1* reprime la expresión de *Wnt7a* en el ectodermo ventral, restringiéndola al ectodermo dorsal; además

Wnt7a induce la expresión en el mesodermo dorsal de *Lmx-1*, el cual especifica la parte dorsal y contrarrestando la inducción ventral de *En-1*.

1.5 Interacción de los diferentes centros de señalización.

El establecimiento de los ejes próximo-distal, antero-posterior y dorso-ventral son procesos muy relacionados y coordinados. Así pues, sonic hedgehog en la ZPA activa la expresión del gen *Fgf-4* en la región posterior de la AER. La actividad de la proteína *FGF-4* es importante para incorporar células mesenquimáticas en la zona de progreso y (junto con *Fgf8*) mantienen la expresión de *Shh* en la ZPA.

Sonic hedgehog permite la activación de *Fgf4* de la AER al inducir la expresión de *Gremlin*, el cual es un antagonista de BMP, que a su vez impide que las BMP del mesodermo inhiban a las Fgf de la AER (Zuñiga et al, 1999). De esta manera, la AER y la ZPA se regulan mutuamente a través de una retroalimentación positiva de *Shh* y *Fgf 4* (Todt y Fallon, 1987; Laufer et al, 1994, Niswander et al, 1994) (Fig 13).

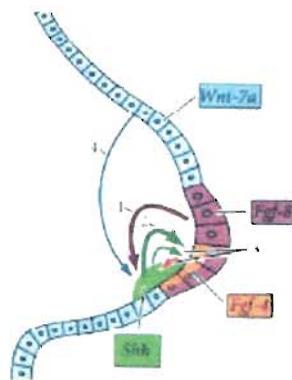


Figura 13.- Interacción entre los tres ejes en el desarrollo de la extremidad. 1.- El establecimiento de la ZPA (Shh) por la AER (FGF8); 2.- La inducción de FGF4 (en la AER) por Sonic hedgehog (en la ZPA) 3.- El mutuo mantenimiento de FGF4 y Sonic hedgehog. 4.- El mantenimiento de Shh por Wnt7a (en el ectodermo dorsal). Las flechas anchas indican inducción mientras que las delgadas mantenimiento (Gilbert, 2000).

También se ha observado que los ratones deficientes en *Wnt7a* no sólo pierden estructuras dorsales, sino también dedos posteriores, por lo que es posible que *Wnt7a* sea necesario para especificar el eje antero-posterior (Yang y Niswander, 1995). Lo mismo ocurre con embriones de pollo. Yang y Niswander (1995) removieron el ectodermo dorsal de extremidades en desarrollo y encontraron que se perdieron elementos posteriores en la extremidad. La conclusión de esta pérdida de elementos posteriores fue la reducción en la expresión de *Shh*. Este hecho se comprueba con la expresión de *Wnt7a* por medio de un vector viral, el cual es capaz de reestablecer el ectodermo dorsal así como la expresión de *Shh* y los elementos posteriores.

Estos resultados muestran que la expresión de Sonic hedgehog en la ZPA activa la expresión de *Fgf4* y después de los *Wnt*. Esto nos demuestra que los centros de señalización establecen los tres ejes embrionarios, están coordinados altamente.

1.6 La identidad de los dedos y señales moleculares que la determinan.

La actividad de SHH también se relaciona con el número de dedos y la identidad de éstos. Al parecer, la identidad de cada dedo se relaciona con el mesodermo interdigital, es decir, la región de mesénquima que experimenta apoptósis para dejar libres los dedos. Un buen modelo para el estudio de la identidad de los dedos es el embrión de pollo tiene 4 dedos en la pata, cada uno de ellos se distingue por el número de articulaciones, el tamaño y morfología. Así, el dedo I es pequeño, con 2 falanges pequeñas y una articulación; el dedo II tiene 3 falanges y 2 articulaciones; el dedo III tiene 4 falanges con 3 articulaciones, y el dedo IV tiene 5 falanges con 4 articulaciones. Dahn y Fallon (2000) observaron que al remover el interdígito dos, el dedo II se transforma en dedo I; mientras que cuando remueven el interdígito 3, el dedo 3 se transforma en dedo 2. Estos cambios de identidad pueden deberse a los cambios en los niveles de BMP dentro de cada

interdígito debido a que, al poner Nogina (antagonista de BMP), en los interdigitos, el dedo 3 se transforma en dedo 2 (Fig. 14).

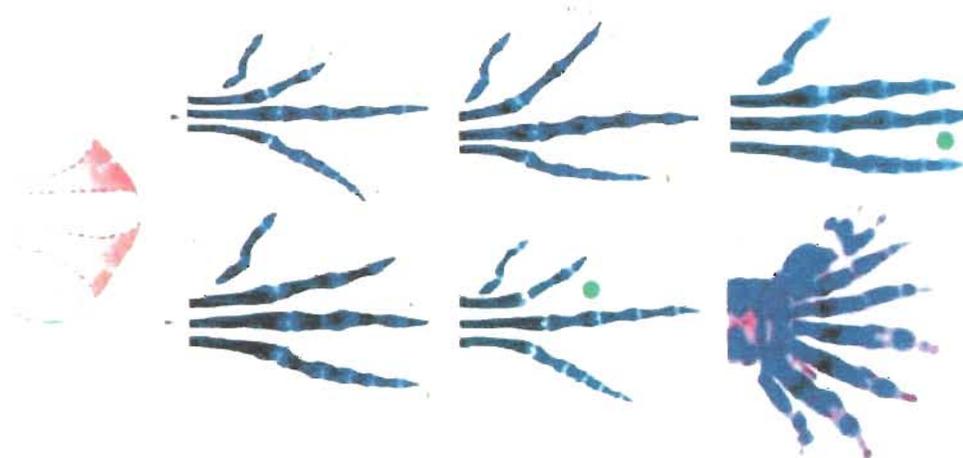


Figura 14.- Cambios en la identidad de los dedos producidos por la remoción del interdígito y el bloqueo de BMP. Otra molécula relacionada con la identidad digital es Gli3. Se muestra su mutante (Gli3^{-/-}). En la figura se muestra una pata control (D) con sus cuatro dedos característicos en el pollo (2-4) y sus interdigitos 2 y 3 (rojo). En la figura A se observa un esquema en el cual se muestra el retiro de los interdigitos 2 y 3. Su resultado mostrado en la figura B y C respectivamente con lo cual ocurre una transformación del dedo 2 hacia dedo 1 y de un dedo 3 hacia un dedo 2. Al colocar una perla con Nogina -antagonista de BMP- (punto verde) en el interdígito 2 ocurrió una transformación del dedo 2 en dedo 1. Así mismo al poner la perla en el interdígito 3, el dedo 3 se transformó en dedo 2. En la figura (G) se muestra Gli3^{-/-} y como resultado se presenta polidactilia y pérdida de la identidad en el ratón (Gilbert, 2003)

Sin embargo, se sabe que el establecimiento de la identidad de los dedos ocurre muy temprano. La explicación de la identidad y morfología de los dedos puede basarse en la hipótesis del morfógeno de Wolpert (Tickle, 2003) puesto que se postula que las células de la ZPA producen la proteína, SHH, esta señal que instruye a las células a formar los dedos más posteriores, se especula que ésta actúa como un morfógeno. En consecuencia, el destino de las células de la extremidad se especifica de acuerdo a un valor umbral dependiendo de su distancia a esta proteína (Zeller, 2004). La función de SHH en la extremidad se

conoce a partir del estudio del ratón mutante para el gen que codifica para esta proteína, el cual resulta en la pérdida completa de la úlna y de los dedos 2 al 5 mientras que el dedo 1, homólogo a nuestro pulgar no se encuentra afectado (Tickle, 2003). La producción de SHH trae aparejada la inhibición de la proteólisis de Gli3 (Wang et al, 2000; te Welscher et al, 2002). El factor de transcripción GLI3 de 1597 aminoácidos de longitud, homólogo de *cubitus interruptus* de *Drosophila*, se acumula en el citoplasma y es llevado al núcleo en asociación con un complejo unido a microtúbulos. En ausencia de la señal de SHH, la fosforilación de Gli3 dependiente de PKA genera un fragmento amino-terminal de aproximadamente 1206 aminoácidos que se concentra en el núcleo y funciona como represor de SHH, por lo que se tiene la hipótesis de que Gli 3 en su forma represora participa en la identidad digital. Harfe et al (2004) han marcado todas las células que expresan *Shh* y sus descendientes con el gen reportero de la β -galactosidasa, como resultado se observa que las células descendientes de la ZPA dan origen a los dedos 5 y 4 (los más posteriores) parte del dedo 3 y la úlna. Este mismo estudio revela que el destino de la expresión de SHH se restringe a la región posterior de la extremidad, puesto que los dedos 5 y 4 dependen completamente del tiempo de su expresión y de un mayor tiempo de exposición. El dedo 3 recibe los mismos niveles que el dedo 5, pero a intervalos más cortos de tiempo, en contraste para la formación del dedo 2 se requiere de la concentración de SHH que sea transportada al sitio. El dedo 1 es independiente de la señalización de SHH puesto que mutaciones inactivadoras de SHH, solo generan extremidades truncadas sin elementos posteriores.

Los ratones deficientes para el factor de transcripción Gli3 muestran polidactilia y pérdida de identidad de los dedos (Ahn y Joyner, 2004), lo que sugiere que este gen está involucrado en la identidad y número de dedos. La formación del dedo 1 es independiente de SHH y probablemente dependa de la presencia de Gli3 en su forma represora (Wang et al, 2000; te Welscher et al, 2002).

1.7 Condrogénesis y osificación de la extremidad en estado embrionario.

Los mecanismos que establecen la polaridad de los primordios de las extremidades y la identidad de los dedos preceden en el tiempo a la formación de los dedos. En este apartado se explican los mecanismos por los cuales se forman los dedos.

Las activinas son miembros de la familia del TGF β a los cuales se les atribuye funciones importantes en la inducción primaria de la condrogénesis durante la formación de los dedos (Merino et al, 1999b). La *Activina* β A se expresa en los dedos en el estadio 25 HH del embrión pollo (Hamburguer y Hamilton, 1951). El papel de las activinas en la inducción de la condrogénesis se confirma con los experimentos de Merino et al (1999b) que al colocar perlas impregnadas con activina en el interdígito inducen la formación de un dedo extra. De igual manera, en modelos *in vitro*, la administración exógena de la activina A promueve la condrogénesis en cultivos de micromasas (Jiang et al, 1993; Chen et al, 1993). Por otro lado, al bloquear la función de la *Activina* con la aplicación de su antagonista Folistatina, se inhibe la formación de los dedos. Sin embargo, este antagonista no bloquea la condrogénesis inducida por TGF β , sugiriendo que la señalización por activinas es la inductora de la condrogénesis y que probablemente el TGF β participe después en la cascada molecular que lleva a la condrogénesis (Chimal-Monroy et al, 2003), además la expresión de TGF β 2 que ocurre después de la *Activina* β A (Merino et al, 1998; 1999a; Chimal-Monroy et al, 2003). Al igual que con la *Activina* β A, la administración del TGF β 2 en las regiones interdigitales induce la formación de dedos extra (Gañán et al, 1996). Estos resultados sugieren que tanto activinas como TGF β están involucradas en la formación de los dedos. Esta redundancia de señales condrogénicas puede explicar por qué la interrupción experimental de TGF β 2 (Sanford et al, 1997) o del gen de *Activina*, por si solos (Matzuk et al, 1995) en el ratón, no resultan en ausencia de elementos esqueléticos.

Ya se mencionó que la aplicación de TGF β o ACTIVINAS en el interdígito induce la condrogénesis. Este proceso permite recapitular los eventos moleculares que ocurren durante la formación de los dedos. Así tenemos que la expresión del gen maestro de la condrogénesis, Sox9, se induce a los 30 min después de aplicar los inductores, así como la expresión de otros genes Sox como Sox8 (1 hora después), la forma larga de Sox 5 (L-Sox5) y Sox6 (entre 8 y 12 horas después) (Chimal-Monroy et al, 2003). La expresión de Sox9, Sox8, L-Sox5 y Sox6 prefigura a los elementos esqueléticos durante el desarrollo de éstos. La eliminación de Sox9 resulta en ausencia de elementos esqueléticos, mientras que la sobre-expresión de este gen en líneas celulares no condrogénicas las induce al linaje condrogénico (Bi et al, 1999; Akiyama et al, 2002; Lefebvre et al, 1998; Sekiya et al, 2000; Smits et al, 2001; Healy et al, 1999). En el humano, en el síndrome denominado displasia campomélica (CD), se ha observado la participación directa del factor de transcripción Sox 9 en el control de la condrogénesis (Foster et al, 1994 en Abarca-Buis, 2002). Este padecimiento está caracterizado por un enanismo severo en el que los huesos largos se presentan arqueados con hipoplasia en la cintura pélvica y escapular, así como anomalías en la columna vertebral. La CD se debe a mutaciones en el gen Sox 9, que en condiciones de haploinsuficiencia, no permite la expresión de componentes de la matriz extracelular (MEC) propios del cartílago tales como la colágena II, las colágenas IX y XI y el agrecano (Bi 1999; Lefebvre y de Crombrughe, 1998). La inactivación condicional de Sox9 en el mesénquima indiferenciado de la extremidad en el ratón se reduce completamente a la formación del esqueleto utilizando el sistema de recombinación Cre (Akiyama et al, 2002).

Por otro lado, se sabe que L-Sox5 y Sox6 controlan la transcripción de moléculas de la matriz extra-celular (MEC), como son la colágena tipo II, el agrecano entre otros, esto permite cambios en la composición de la MEC al ocurrir la maduración del cartílago (Chimal-Monroy et al, 2003).

De igual manera, se ha sugerido que la señalización de *Bmp* tiene un papel importante en la inducción de la condrogénesis. Sin embargo, durante la formación

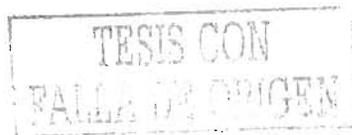
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de los dedos el receptor de Bmp (*Bmpr1b*) se expresa en etapas posteriores a la expresión de *Sox9*, *Activinas* y *Tgfβ*. Aunque en la condrogénesis en los interdígitos inducida por TGFβ la expresión de *Bmpr1b* ocurre antes que la expresión de *Activina βA* y *TGFβ* y posterior a la expresión de *Sox9*. *Nogina* bloquea la condrogénesis, sugiriendo un relevo de funciones entre las distintas moléculas. Así tenemos que *Activinas* o TGFβ inducen la expresión de *Sox9* y como consecuencia de esto se expresa el receptor *Bmpr1b* que permite que las *Bmp* mantengan la condrogénesis, y la expresión de las mismas *Activinas*, *Tgfβ* y de *Sox9* (Merino et al, 1998; Hongyan and Niswander, 1996; Chimal-Monroy et al 2003). La señalización de BMP es regulada a través de sus antagonistas naturales como *Nogina* o *Ventroptina*. Estos genes se expresan donde ocurre condrogénesis. La *Ventroptina* se expresa antes que ocurra la síntesis de una MEC específica de cartílago, mientras que *Nogina* se expresa poco después (Chimal-Monroy et al 2003).

1.8 Eventos en la formación de las articulaciones y genes participantes.

Una vez establecidos los elementos esqueléticos, éstos crecen y se segmentan. La segmentación ocurre con la formación de las articulaciones, la primera evidencia morfológica que indica la formación de las articulaciones es la aparición de la interzona. La interzona está formada por células aplanadas que se organizan en tres capas celulares: una lámina central intermedia con baja densidad celular flanqueada por dos áreas densamente pobladas. La capa central desaparece posiblemente por apoptosis y posteriormente se forma una hendidura en la articulación (Fig. 15).

Fell y Canti (1934) sugieren que la formación de las articulaciones depende del crecimiento de elementos cartilaginosos adyacentes, mientras que Holder



(1977) muestra que al remover gran parte del radio y la ulna, se puede formar la interzona de la articulación.

Las dos áreas de alta densidad celular de la interzona se diferencian en cartilago articular y cubren la superficie articular de los huesos adyacentes. En la siguiente etapa llamada cavitación, los niveles del glucosaminoglicano hialuronato se incrementan en la MEC resultando en un decremento en la adhesión. Con este fenómeno se forman elementos esqueléticos completamente separados (Craig et al., 1990; Archer et al., 1994; Edwards et al., 1994; Pitsillides et al., 1995; Dowthwaite et al., 1998). El cartilago articular una vez formado se mantiene por la acción *Gdf5* el cual se expresa en la interzona.

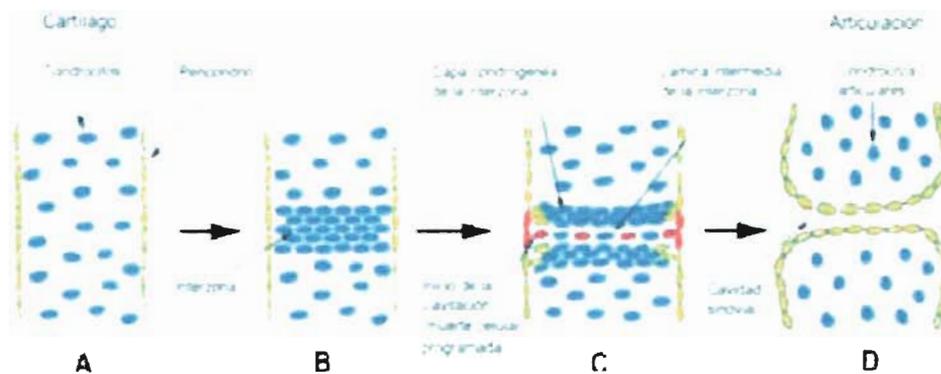


Figura 15.- Formación de la articulación sinovial. Constitución de la interzona y el fenómeno de la cavitación. El elemento esquelético a segmentarse constituido por células aplanadas (A) comienza a organizarse en tres capas de células, una lámina média central flanqueada por dos capas condrogénicas que producirán el cartilago hialino articular y se forma lo que se conoce como interzona (B). Al mismo tiempo las células de la lámina intermedia mueren por apoptosis y el cartilago de los extremos se separa en el fenómeno conocido como cavitación (C). La cavitación se completa con la separación de los elementos esqueléticos para después formarse la cavidad sinovial (D). Representación (Garcíadiego-Cazares, 2005).

El ratón mutante de *Gdf-5* presenta braquipedismo caracterizado por un acortamiento de la extremidad y ausencia de algunas articulaciones (Francis-West, 1999; Grunenber y Lee, 1973; Storm y Kingsley, 1999). Sin embargo, la sobreexpresión de GDF5 tanto en ratones como en pollos da lugar al crecimiento

ectópico del cartilago que resulta en la fusión de cartílagos de las articulaciones (Francis-West, 1999a; Merino 1999b; Storm y Kingsley, 1999). De igual manera, el mutante sencillo o el doble mutante de *Gdf5* y *Gdf6* resultan en la inhibición de la formación de las articulaciones (Settle et al, 2003). Estos datos sugieren que tanto *Gdf5* como *Gdf6* son necesarios en el desarrollo de la articulación. Sin embargo, los experimentos de ganancia de función con *Gdf5* muestran que no es suficiente para iniciar la formación de las articulaciones.

El gen *Gdf 5* tiene al menos tres funciones durante la formación de articulaciones del esqueleto apendicular. Primero promueve la iniciación de la condrogénesis; segundo promueve la proliferación de los condrocitos incrementando el tamaño de los elementos esqueléticos finales (Francis-West et al 1999a; Merino et al, 1999b); y finalmente, mantiene la articulación temprana (Storm and Kingsley, 1999).

Entre las moléculas que se expresan en las articulaciones en formación están *Wnt14*, *Gdf-5*, *Gdf-6*, *Bmp-2*, *Bmp-4*, *Activina A*, *Activina B* y *Tgf β 2* lo que sugiere que podrían estar involucradas en la formación de las mismas (Francis-West et al, 1999; De Crombrughe et al, 1996; Storm et al, 1994; Storm y Kingsley, 1996; Wolfman et al, 1997; Zou et al, 1997 en Santesteban 2001). La sobreexpresión de *Wnt14* resulta en la formación de articulaciones ectópicas e induce cambios moleculares y morfológicos característicos de la transición de la interzona de regiones que normalmente formarían una articulación además inhibe la condrogénesis (Hartman y Tabin 2001).

WNT14 induce la cascada molecular que lleva a la formación de las articulaciones e induce la expresión de *Gdf5*, *Autotaxina*, *Cordina* y *CD44*. Por otra parte *Wnt 14* inhibe la expresión de *Sox 9*, *Colágena tipo II* y *tipo IX*, *Agrecano* y *Nogina* lo que indica que WNT14 está inhibiendo la condrogénesis.

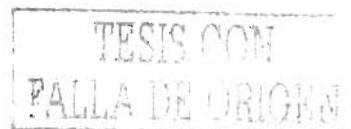
Las moléculas *Bmp-2* y *Bmp-4* se expresan en las regiones que formarán la articulación (Francis-West et al, 1999; Storm y Kingsley, 1999; Merino et al, 1999). *Nogina*, el antagonista de *Bmp*, se expresa inicialmente en las condensaciones de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cartilago incluyendo la presunta articulación (Archer et al, 2003). Sin embargo, la función de estas moléculas permanece desconocida ya que el knock out de *Nogina* o la sobreexpresión de *Bmp*, resultan en la pérdida de las articulaciones y en el sobrecrecimiento del cartilago, lo que sugiere que *Bmp* tiene una participación en la promoción de la condrogénesis y en la inhibición de las articulaciones (Macias et al, 1997; Duprez et al, 1996). *Cordina* (otro antagonista de *Bmp*), se expresa en la interzona de la articulación (Francis-West et al 1999) pero su función en las articulaciones, es todavía desconocida, aunque es posible que inhiba la maduración del cartilago, el cual es un paso decisivo en este proceso (Zhang et al, 2002).

La formación de las articulaciones se relaciona con la diferenciación condrogénica aunque se conoce poco acerca del control entre la proliferación de los condrocitos y el destino pre-hipertrófico o pre-articular. Recientemente se descubrió que la integrina $\alpha 5\beta 1$ está involucrada en la decisión entre los destinos pre-articular o pre-hipertrófico de los condrocitos en proliferación. El bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con anticuerpos neutralizantes induce la formación de una articulación ectópica con un plano de segmentación perpendicular al eje del hueso (Garciadiego-Cázares et al, 2004), sugiriendo que la integrina inhibe la formación de la articulación y- promueve la diferenciación de los condrocitos hacia la hipertrofia. Por lo que la presencia de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en los condrocitos en proliferación los convierte en condrocitos prehipertróficos (Fig. 16).

La participación de $TGF\beta$ en la formación de las articulaciones no se ha determinado pero el bloqueo de la señal del factor de transcripción *Smad3* observada en el ratón mutante induce la degeneración en las articulaciones. Estos ratones presentan colágena tipo X en el cartilago articular que indica la diferenciación hacia la hipertrofia. Sin embargo, no es claro si *Tgf β* actúa durante el desarrollo de la articulación o después que se haya formado para mantener el fenotipo articular.



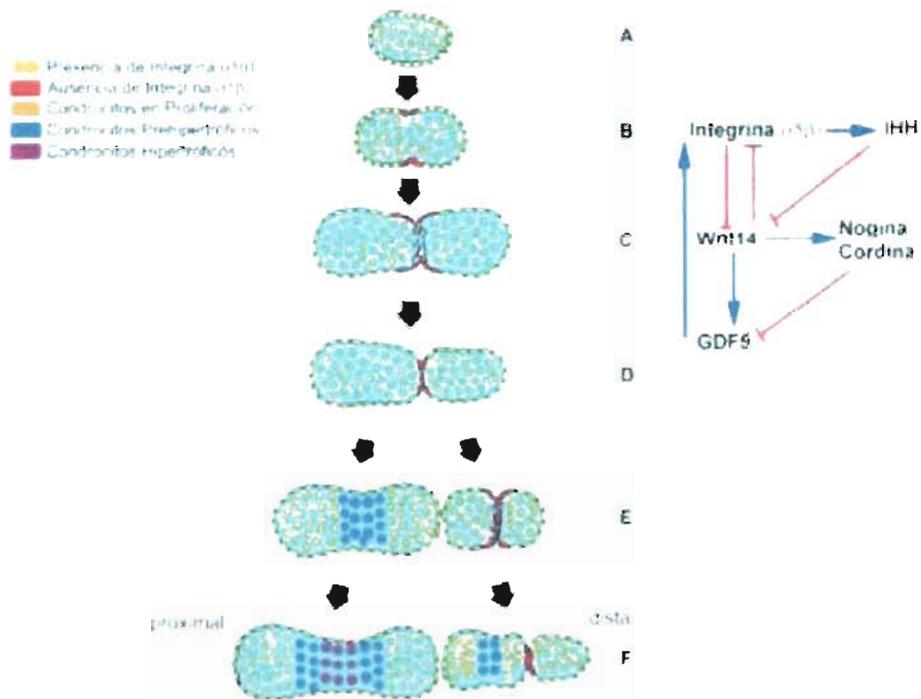


Figura 16.- La formación de las articulaciones y el cartilago son procesos coordinados por la integrina $\alpha 5 \beta 1$ durante el desarrollo del esqueleto apendicular (A-D). Un elemento esqueleto formado por condrocitos en proliferación (A). La diferenciación del cartilago inicia con la agregación de mesénquima precondrogénico (B-D). Cuando los elementos esqueléticos alcanza cierto tamaño, las células desde el centro de la condensación salen del ciclo celular si la integrina $\alpha 5 \beta 1$ se inhibe en el pericondrio los condrocitos en proliferación siguen el programa para formar articulaciones y separan un elemento esquelético de otro (E,F). Una vez que se ha segmentado el elemento esquelético, cada uno de ellos continúa su desarrollo. Cuando el elemento más proximal del esqueleto apendicular mantiene la expresión de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en el pericondrio y los condrocitos en proliferación pasan por la prehipertrofia y se hacen hipertrofos para después osificarse. En el elemento mas distal se repiten los pasos (B-D) para formar entidades esqueléticas por separado. La acción de las BMP para promover la formación de articulaciones o la maduración de cartilago depende de la presencia de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en el pericondrio. A la derecha se muestra un esquema de la regulación de la señalización entre la integrina $\alpha 5 \beta 1$ y Wnt-14. Donde la integrina promueve la diferenciación de los condrocitos, mientras que la señalización de Wnt-14. Donde las integrinas promueven la diferenciación de los condrocitos, mientras que la señalización Wnt induce la formación de articulaciones. Estos procesos son complementarios durante la morfogénesis del esqueleto (Garciadiego-Cázares, 2005)

1.9 Mecanismos celulares y señales moleculares que participan en el desarrollo del tendón.

Una vez que se establecieron las coordenadas espaciales en el primordio de la extremidad, se desarrollan los diferentes elementos esqueléticos. La funcionalidad de los elementos esqueléticos depende de su asociación con el músculo y a su vez, ésta asociación depende de la formación de los tendones, estructuras que permiten que la fuerza muscular sea transmitida a los elementos esqueléticos.

Los tendones son estructuras ricas en diferentes tipos de Colágena y otras moléculas de la MEC que mencionaré mas adelante (Pérez et al 2003; Edom-Vovard et al 2004). El papel de los tendones es transmitir la fuerza ejercida por el músculo al punto donde se inserta con el hueso (Pérez et al, 2003). Los tendones tienen dos sitios de inserción: uno al músculo y otro al hueso. La interfase músculo-tendón se ha estudiado mejor que aquella que involucra la unión tendón-hueso. La fuerza muscular es transmitida primero a la membrana de la fibra muscular (el endomisio, perimisio, epimisio) y por último a la unión miotendinosa.

Aunque en su mayor parte los tendones están formados por un entorno no celular La unidad celular básica del tendón es un tipo de fibroblasto llamado tenocito el cual produce fibras de colágena. Este tipo de fibras están agrupadas en vainas que miden milímetros de longitud. La colágena da a los tendones sus propiedades de resistencia al estiramiento, característicos de este tejido. Las vainas de fibras de colágena quedan unidas por tejido conjuntivo llamado endotendineo. La capa externa de todo el tendón que rodea a la vaina central de fibras de colágena se llama peritendineo y epitendineo (Benjamín y Ralphps, 2000 en Edom-Vovard 2004).

El tendón maduro está formado principalmente por colágena tipo I y en menor cantidad se encuentra asociado a colágena III y V, formando fibras heterotípicas (Canty y Kadler, 2002). La colágena no fibrilar denominada FACID (colágena asociada a las fibrillas triple hélice) como la XII y XIV se encuentra también en tendones en desarrollo.



Otros componentes de la MEC, presentes en los tendones son la elastina, emilina, fibrilina I y los proteoglicanos: biglicano (Ameve et al, 2002; Waggett et al, 1998), decorina (Birk et al, 1995; Danielson et al, 1997; Waggett et al 1998), fibromodulina (Kurminskaya y Birk 1998), lumicano (Ezura et al, 2000; Waggett, 1998) y la glicoproteína tenacina C (Ros et al 1995).

Cambios estructurales en la MEC preceden a la formación de los tendones. Su estructura consiste en una lámina del mesénquima que corre paralela y distalmente a la membrana basal del ectodermo (Hurlé et al, 1990). Previo a la formación de los tendones se construye un blastema pretendinoso. Este blastema es una condensación de mesénquima, rica en matriz extracelular arreglada en dirección longitudinal a lo largo del eje dorso-ventral de cada dedo y está asociado a la lámina del mesénquima (Hurlé et al, 1990) (Fig. 17 y 18)

En una primera etapa de la formación del tendón descrita por Hurlé y colaboradores (1990), se enuncia la aparición de un número de fibrillas dorso-ventrales que corren desde la lámina del mesénquima hacia el bloque cartilaginoso del dedo en desarrollo y se llega a formar un blastema tendinoso que puede ser observado con tinción de plata (Fig 19).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

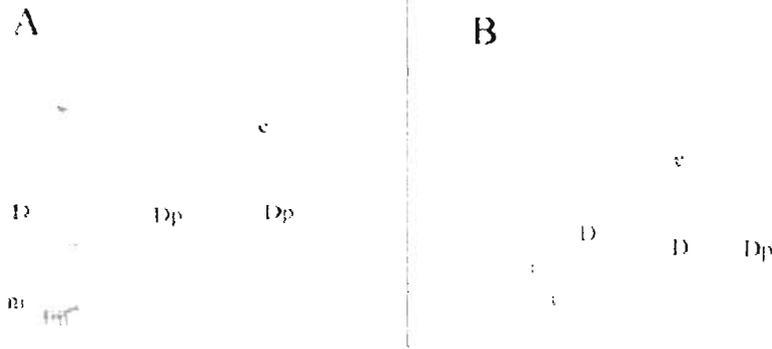


Figura 17.- Cambios que experimenta la matriz extracelular durante la formación del blastema tendinoso. Se muestra (A) la matriz extracelular antes del establecimiento de los tendones. En una etapa inicial la lámina de mesenquima (lm en rojo) corre en los extremos de los bloques musculares (m) hacia la membrana basal del ectodermo (e) mientras que el dedo (D) se está formando (Dp) en las partes más distales. En etapas posteriores, el blastema tendinoso ocupa el mismo lugar que anteriormente lo hacia la lámina de mesenquima. Los paquetes tendinosos (t en rojo) se anclan a los cartílagos de los dedos (D) (Tomado y modificado de Hurlle et al 1989).

En una segunda etapa, el blastema tendinoso dorsal tiene forma aplanada en corte transversal mientras que el blastema ventral tiene forma redondeada al corte (Fig. 20). En la etapa 3, se aumenta el área de contacto del blastema con la lámina del mesénquima a medida que progresa el desarrollo embrionario. Se forma un surco central en la lámina de mesénquima y se rodea por una matriz condensada de los tendones y poco después la lámina de mesénquima experimenta una desintegración progresiva.

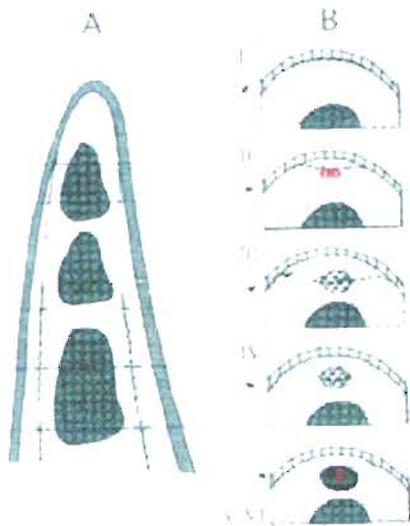
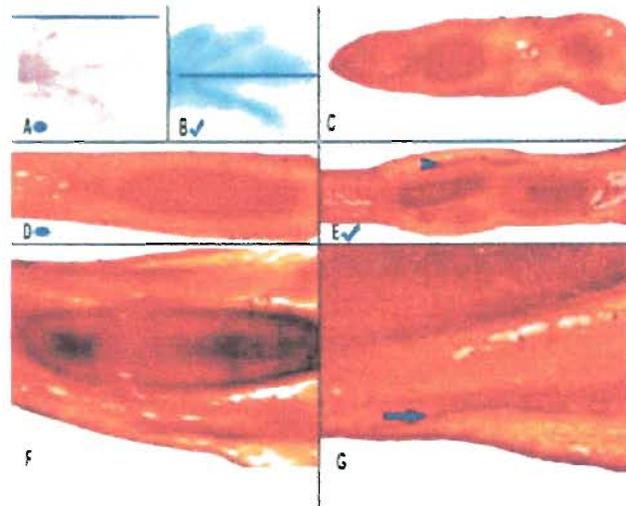


Figura 18.- Representación esquemática del corte longitudinal y transversal de un dedo. El corte longitudinal (A) realizado en un dedo en desarrollo, muestra que la lamina de mesenquima en un nivel proximal corre paralelo al blastema tendinoso (T en rojo). En los niveles II y III en un corte transversal, se observa que la lamina de mesenquima (lm) precede a la formación del tendón (T) observado en los niveles IV-VI. Lamina de mesenquima (lm). (Tomado y modificado de Rus et al, 1995).



Pie de figura 19.- Histología del tendón del I 30-31 III en corte longitudinal. En el panel A se muestra una hibridación in situ de 16J12 (29 III) en el que se presenta la expresión incipiente de este gen en los tendones y se presenta el sitio de corte de una pata de pollo tenida con la técnica de metanamina-plata correspondiente con la panel D con asterisco relleno en el cual aun no se observa tendón, compárese con el panel E en el cual se muestra un tendón bien formado (ver cabeza de flecha azul). La hibridación de Smad 3/31 III (panel B) muestra una progresión mas avanzada del corte lo que corresponde con la figura E antes mencionada. Los tendones se originan a partir de la lamina de mesenquima observada a detalle en la panel C (flecha azul). En todas las figuras se muestra la progresión del corte en sentido antero-posterior. (C-G).

En la etapa 4 se incrementa el espesor de los tendones en desarrollo. El mesénquina que los rodea, así como el cartílago se condensan progresivamente y se forma una estructura tendinosa asociada al tendón flexor

En la etapa 5 el blastema ventral se diferencia para formarse un tendón maduro, el cual crece y se separa del tendón flexor temprano debido a la formación de una hendidura que separa al tendón flexor temprano y el tendón maduro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

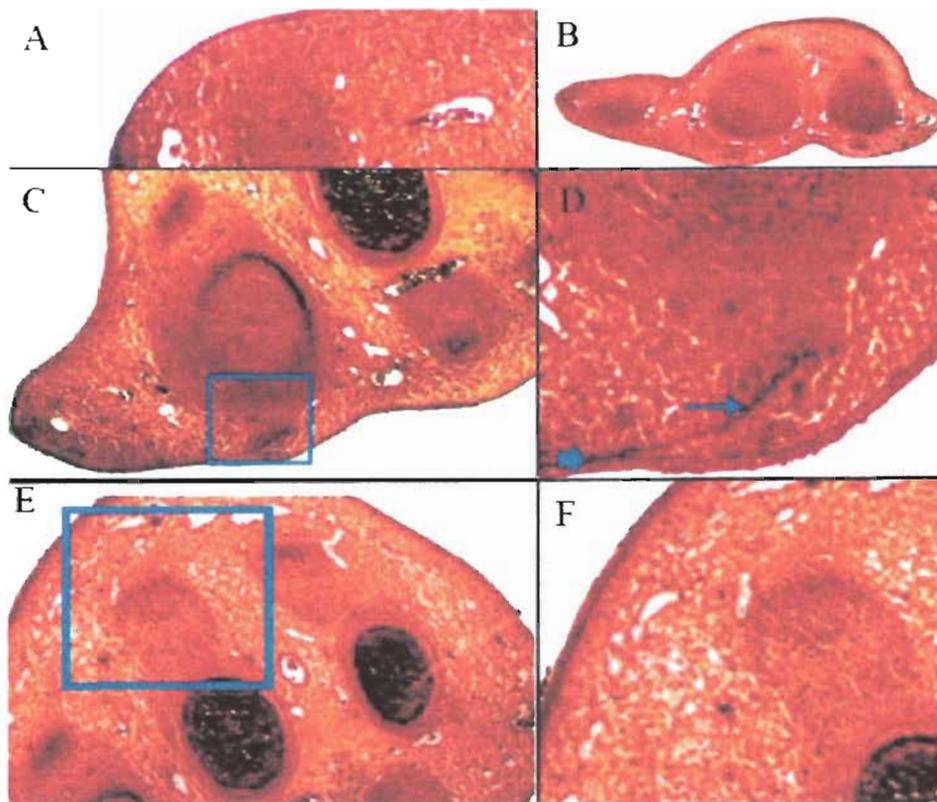


Figura 20.- Histología del tendón visto en corte transversal a diferentes niveles en sentido proximo-distal. Se muestra el acercamiento de un corte distal de la extremidad posterior de pollo, en donde el tendón aún no está presente (A), en cortes más proximales se observa el corte de tres dedos (B) y en los cuales los tendones dorsales y ventrales se observan por arriba y debajo de cada dedo. En un corte aún más proximal se observa una línea salir de la lámina basal; la lámina de mesénquima(C) con detalle en cuadro azul observado en (D) donde la pequeña flecha azul rellena indica la lámina basal y la gran flecha delgada la lamina de mesénquima de la cual se originaran los tendones como el que se observa de gran tamaño (recuadro azul) (E) y a detalle (F).

El origen embrionario de los tendones fue muy poco comprendido hasta los trabajos de Brent y colaboradores (2003). Ahora se sabe que los tendones de la extremidad se derivan de la placa lateral del mesodermo, mientras que los tendones asociados a los músculos segmentados de la columna vertebral derivan de las somitas. Las costillas y sus músculos derivan del mesodermo paraxial. El cual experimenta segmentación y se organiza en pares de bloques de células (las somitas). Las somitas se organizan a ambas partes del tubo neural y una vez

diferenciadas parecen esferas epiteliales. La porción ventromedial de epitelializa y constituye el esclerotomo. La parte ventro-medial permanece epitelial y forma el dermomioto. Las células derivadas del dermomioto. Las células derivadas del dermomioto se intercalan entre el esclerotomo y la vaina epitelial dorsal, (ahora llamada dermatomo), para formar el miotomo.

Los huesos de la columna vertebral, vértebras y costillas tienen su origen en el esclerotomo, El miotomo forma los precursores de los músculos del cuerpo asociados a los huesos y el dermatomo forma la dermis dorsal. El nuevo compartimento somítico, denominado sindetomo, que se origina del dominio lateral del esclerotomo, el cual origina los tendones. (Brent et al, 2003; Debrulle y Pourquie, 2003).

1.9.1 El sindetomo: la capa somítica que origina los tendones.

Brent et al (2003), observaron que *Scleraxis* (un marcador molecular temprano de los tendones). se expresa en los tendones del eje de cuerpo y de las extremidades. La expresión de *Scleraxis* se restringe a un subgrupo de células somíticas, justo en la interfase del miotomo y el esclerotomo. El linaje celular resultante muestra poblaciones celulares que derivan del dominio dorsolateral del esclerotomo, presentes en los blastemas tendinosos, los cuales se originan de otro compartimento somítico, el cual no se mezcla con las células que le rodean. Al compartimento somítico que presenta los progenitores del tendón se le llamó sindetomo (del griego sindesis, unir junto).

1.9.2 Aproximaciones clásicas al estudio del desarrollo del tendón

En 1990, Hurlé y colaboradores, mostraron la importancia de la AER en el desarrollo del tendón. Al extirpar quirúrgicamente la AER de la punta del dedo de pollo observaron el truncamiento de éste y un engrosamiento de la membrana

basal en la región, en la cual se realizó la operación de manera independiente de la membrana basal del ectodermo. Además, se fusionó la parte dorsal con la ventral del tendón en la punta del dedo truncado. Ellos proponen que este desarrollo anormal del tendón en la punta del dedo puede deberse a que hay señales moleculares en la AER que controlan el desarrollo del tendón

Por otro lado, al inducir la formación de dedos extras retirando una porción de ectodermo local, se ha observado la formación de tendones asociados al cartílago después de 6 días de realizada la operación.

En otros experimentos (D'Souza y Patel, 1999), observaron que al truncar el cartílago, también se trunca el tendón y se pierde la expresión de moléculas asociadas al tendón, como *Efrina (eph-A4)* y *Follistatina*, lo que indica que el cartílago también participa en la comunicación molecular con otros órganos como el músculo para la formar y mantener el tendón.

1.9.3 Genes involucrados en el desarrollo del tendón.

Inicialmente se han relacionado los patrones de expresión de diferentes moléculas con los tendones por suponer que éstos juegan algún papel en su desarrollo. Como ya se ha mencionado, *Scleraxis* se expresa en los tendones en desarrollo y considera un marcador de tendones en el embrión de ratón y pollo. En el estadio 14.5 HH de pollo los tendones se insertan a las falanges en el pollo, mientras que los tendones axiales se insertan a los músculos pélvicos y escapulares. En el ratón, *Scleraxis* se expresa primero en la región próximo-media y superficial en la extremidad del ratón. Por otro lado, *Scleraxis* no solo se expresa en los tendones apendiculares sino que además en los tendones axiales. Se ha observado en el embrión de pollo la expresión de este gen en el mesénquima intersomático, en etapas tempranas.

Además de *Scleraxis*, se han reportado muchos tipos de moléculas expresadas en el tendón distal en el autópodo de pollo como los componentes de la matriz extracelular *Colágena I, IV* y *Elastina* (Hurlé et al, 1989; Ros et al. 1995; D'Souza

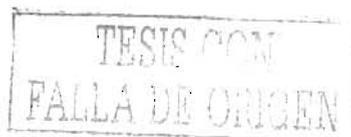


y Patel, 1999 en Edom-Vovard, 2002), el receptor con actividad de cinasa de tirosina Eph-A4 (*efrina*), y los factores de transcripción *Six 1* y *Six2* (Oliver et al, 1995), *Eya 1* y *Eya 2* (Xu et al, 2002). De éstos, *Six2* y *Eya 1* son marcadores de los tendones extensores dorsales a nivel de los dedos. El TGF- β 2 también se expresa en los tendones distales. Sin embargo, no se ha establecido una correlación entre todas las moléculas y los pasos necesarios que conduzcan a la formación del tendón. El marcador *Eya 1* se expresa primero en el tendón flexor ventral y después en el extensor dorsal. *Follistatina*, un antagonista de *Activinas* se expresa alrededor de los tendones. Otras moléculas que también se expresan en los tendones son *Tenascina*, *Fgf 8*, *Tenomodulina*, *Fgf 4* y *Fgf 18* (Edom-Vovard, 2002).

1.9.4 La regulación de distintos marcadores asociados con el tendón.

La mayor parte de los estudios realizados en el desarrollo del tendón están relacionados con la regulación de la expresión de algunos de los marcadores. Por ejemplo, se ha observado que al implantar una fuente de Fgf 4 usando vectores virales en las extremidades sin músculos y sin nervios, este gen regula positivamente la expresión de *Scleraxis* y *Tenascina* pero no de *Fgf 8* en los tendones (Edom-Vovard, 2002). También se sabe que la aplicación de Nogina induce la expresión de *Scleraxis*. De manera contraria, si ponemos BMP en el tendón disminuye la expresión de los marcadores de tendones lo que está relacionado con una desvinculación con el destino tendinoso.

De igual manera, manipulaciones experimentales para eliminar el músculo o el cartílago influyen en la formación del tendón. Así mismo se ha visto que el truncamiento del cartílago se asocia con el truncamiento del tendón y la pérdida de expresión de *Eph-A4* (marcador de la aparición de tendones) y *Follistatina* (D'Souza y Patel, 1999). Sin embargo, al aplicar Fgf4, se redujo la expresión de *Eph-a4* y *Follistatina* mientras se inhibe la formación del cartílago y los tendones (Edom-Vovard et al 2002). La *Follistatina* es otra molécula que al ser aplicada en



las proximidades del tendón reduce la expresión de *Eph-a4* (D'Souza y Patel, 1999).

Finalmente, en otros experimentos donde se aplicó TGF β 1 en el interdígito en el embrión de pollo, en la etapa 29 HH se induce la formación de elementos esqueléticos y la expresión de moléculas asociadas con la formación del tendón como *Follistatina* y *Efrina Eph-A4*). También se ha observado que al aplicar Bmp-4 se forman tendones divididos (D'Souza y Patel, 1999) y Bmp-2 induce la formación de cartílagos pero no tendones (Wolfman et al, 1997 en D'Souza y Patel, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Planteamiento del problema.

De las interrelaciones moleculares que ocurren durante el desarrollo, la señalización de Tgf β induce, la formación de dedos extras en el interdígito, sin embargo, es clara la participación de TGF beta en la condrogénesis, pero no se conoce el papel de esta señal en la formación de las articulaciones, tendones y menos aun, en la identidad de los dedos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Objetivo General

Comprender algunas de las funciones del TGF β en el desarrollo de la extremidad.

3.1 Objetivos particulares.

3.1.1.- Analizar el patrón de expresión de *Tgf β 2*, *Alk5*, *Betaglicano* y *Smad3* en distintas etapas del desarrollo de la extremidad en el pollo.

3.1.2.- Realizar experimentos de ganancia de función con la aplicación de TGF β exógeno en los estadios 25-26 del desarrollo de la extremidad.

3.1.3.- Bloquear la función del *Tgf β* en la extremidad en desarrollo a través de la expresión de la forma truncada de *Smad3* (Δ *Smad3*) por medio de la electroporación así, como la aplicación de betaglicano soluble.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Hipótesis.

- 1.- El patrón de expresión de *Tgfβ2* coincide con el de Smad 3 en los radios digitales cartilagosos y tendones digitales en el embrión de pollo
- 2.- La función de *Tgfβ*, controla el crecimiento distal de la extremidad y la identidad de los dedos.
- 3.- El bloqueo de la función de la señalización de *Tgfβ* inhibe la formación de los tendones y las articulaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Métodos.

5.1 Animales.

Se usaron huevos de pollo fertilizados provenientes de ALPES, SA, Puebla. Se incubaron por 3 días, 3 ½ días, 4 días, 4 ½ días, 5 días, 5 ½ días, 6 días, 6 ½ días, 7 días, 7 ½ días, 8 días y 8 ½ días. Al término de cada tiempo se procesaron para histología, hibridación in situ, implantación de perlas con proteínas y para su electroporación con los distintos genes a evaluar en este estudio.

5.2 Histología, Técnica de Metenamina-Plata.

Las patas de embriones de 3 días, 3 ½ días, 4 días, 4 ½ días, 5 días, 5 ½ 7 días, 7 ½ días, 8 días y 8 ½ días se disecaron y se fijaron con Carnoy y se deshidrataron como a continuación se enuncia:

Deshidratar con etanol 50 % por 30 minutos, 70 % por 30 minutos, 85 % por 30 minutos, 96 % por 30 minutos, 100 % por 30 minutos. Aclarar con xilol por 30 minutos y pre-incluir en paraplast (Sigma, México) por una noche. Por último se incluyen en paraplast y se cortan en un microtomo a 8 micras. Se coloca cada corte sobre una gota de agua que está a su vez sobre un portaobjetos y éstos se colocaron sobre una plancha de estiramiento de cortes (Leica, Alemania). Los portaobjetos fueron preparados previamente con TESPA (3-aminopropyltriethoxy-silano, (SIGMA, USA) para permitir que los cortes se adhieran a éstos. Las laminillas que tienen los cortes se dejan toda la noche a 37 ° C y al otro día se guardan a 4° C. El día de la tinción se pasa a una caja Couplin y se sigue el siguiente procedimiento:

Se desparafinan los cortes agregando xilol (JT Baker, México) a la caja Couplin y se deja allí durante 10 minutos y al término de este lapso se retira el xilol y se agrega alcohol 96° por 5 minutos, alcohol 85° por el mismo tiempo, alcohol 70°, alcohol 50° y agua destilada también por 5 minutos. Agregamos ácido peryódico (JT-Baker, México) al 1% por 15 minutos. Lavar con agua destilada durante 10 minutos por 3 veces. Oxidar en trióxido de cromo (Tecsiquim, México) al 5% durante una hora. Lavar en agua corriente por 2 minutos. Fijar con bisulfito sódico (JT-Baker, México) al 2% durante minuto y medio. Lavar de nuevo con agua corriente por 5 minutos. Colorear en la solución de metenamina-plata a 60 ° C en la oscuridad por un tiempo que varía de 3 a 6 horas, la tinción debe controlarse bajo el microscopio para lograr una buena tinción. Después de este lapso de tiempo se adiciona ácido sulfúrico (JT-Baker, México) al 5% en sulfato férrico (JT-Baker, México) al 0.2% se utiliza una parte de este diferenciador por 9 de agua, durante un tiempo que varía entre 1 a 10 segundos dependiendo el grado de tinción que se presente es decir a mayor sobre-tinción mayor tiempo. Se lava en agua destilada tres veces durante 2 minutos. Se deshidrata utilizando alcoholes graduales es decir en cada etapa de 5 minutos se adiciona alcohol 50%, 70%, 85%, 96% y 100%. Aclarar con xilol (JT-Baker, México) por 10 minutos y montar las preparaciones con resina sintética (Sigma, USA). Dejamos secar las preparaciones y después de seleccionar los cortes adecuados se toman fotografías en un microscopio Nikon (Japón).

La solución de metenamina plata se prepara de la siguiente manera:

Hexametilentetramina cristalizada (Merck, Alemania) al 3% agregar 100 ml, Nitrato de plata (Sigma, USA) al 5% 5 ml y Tetraborato sódico cristalizado (Sigma, México) al 5% 6 ml.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3 Preparación de laminillas con TESPA.

Sumergir las laminillas en ácido clorhídrico (Química Meyer, México) 10%/etanol 70%.

Sumergir las laminillas en agua destilada.

Cubrir las laminillas con etanol 96%.

Secar en horno a 150° C por 5 minutos y dejar enfriar.

Sumergir las laminillas en TESPA 2% en acetona.

Lavar con acetona (JT-Baker, México) (solo a inmersión).

Lavar con agua destilada (solo a inmersión).

Secar a 42° C

5.4 Hibridaciones In Situ en Whole Mount.

Los embriones de pollo se fijaron con paraformaldehído (Sigma, USA) al 4% y se guardaron a 4° C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se lavaron con PBS frío, Se incubaron en hielo por cinco minutos. Se lavaron e incubaron otra vez con PBS frío. Se incubaron en PBT por cinco minutos a temperatura ambiente Se deshidratan los embriones con metanol absoluto (JT-Baker, USA) y sus diferentes diluciones en PBT, Se comenzó a deshidratar con metanol 25%/75% PBT por cinco minutos, se siguió la deshidratación con un lavado en metanol 50%/75% PBT. Después se lavó con metanol 75%/25% PBT y por último se hicieron dos lavados con metanol absoluto (JT-Baker, USA). En cada fase de la deshidratación se deja incubando con el alcohol correspondiente por cinco minutos a temperatura ambiente. Después se almacena a -20°C.

El día que se va a comenzar la hibridación se rehidratan los embriones con PBT disuelto en metanoles graduales y de la misma manera que se hizo en la hidratación se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente. Primero se lavan los embriones con metanol absoluto dos veces, después con metanol 75%/25% PBT, se siguió la rehidratación con metanol 50%/50% PBT, metanol 25%/75%PBT y por último dos veces con PBT.

En la etapa de permeabilización se incuban los embriones con H₂O₂ 6%/PBT por espacio de 1 hora y se cubrió de la luz, después se lava con PBT en tres ocasiones por cinco minutos. Después se incuba con proteinasa K (Roche, Alemania) 10 µg/ml PBT por 25 minutos a 20°C y a baño maría. Se incubó con paraformaldehído 4%/glutaraldehído 0.2% por 20 minutos, se lavó dos veces con PBT por cinco minutos.

Los embriones se transfieren a en tubos Eppendorf (Eppendorf, Alemania), aquí se agregó el amortiguador de hibridación y se incubó a 65°C por 3 horas. Una vez que la sonda esté preparada (ver preparación de sondas), se diluyen 5 µl de la sonda (cDNA) en 500 µl de buffer de hibridación, se agrega la sonda y se calienta a 80° C por dos minutos y se desnaturaliza pasándola de inmediato a hielo. Después se extrae el amortiguador de hibridación y se agrega la sonda, por último se deja hibridar toda la noche a 67°C.

Al día siguiente se pasan los embriones a frascos de vidrio y se agrega la solución I de lavado precalentada a 65°C por una hora y al cabo de este tiempo se cambió de nuevo la solución y se dejó incubando de la misma manera por espacio de una hora. Se cambia la solución anterior por una mezcla 50%/50% de solución I/solución II precalentada a 65° C por diez minutos, después se hacen tres cambios de solución II a temperatura ambiente, incubando cada vez durante 10 minutos. Se agregó la solución II precalentada a 65°C y se incubó durante una hora. Se cambió la solución anterior por solución II a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se incubó con la solución III durante 10 minutos. Después se cambió la solución anterior y se incubó con solución III precalentada a 65°C durante 30 minutos. Se lavó con una solución TBST-Levamisol 2mM por 10

minutos y en tres ocasiones. Se pasaron los embriones a tubos de plástico y se agregó una mezcla de suero de chivo 10%/TBST-Levamisol por 2 horas y en agitación horizontal. Se agregó la cantidad necesaria de anticuerpo Anti-DIG-AP (Roche, Alemania) 1:2000 diluido en suero de chivo 10%/TBST-Levamisol, durante toda la noche y a 4°C.

Al siguiente día se lavan dos veces con TBST/Levamisol 2mM por 5 minutos cada vez, se cambia la solución anterior por TBST/Levamisol 2 mM y con esa solución se hacen de 10 a 15 lavados de la solución durante 10 minutos cada vez. Enseguida se lavan dos veces con una solución de NTMT-Levamisol 1mM por 15 minutos. Se revelan con BM-Purple (Roche, Alemania) ocultos de la luz hasta que de color. La reacción se sigue a intervalos de tiempos breves (horas). Una vez que la reacción se completó se lavó dos veces con NTMT durante 15 minutos, se lavó tres veces con PBS por un minuto. El primer lavado de PBS se hace inmediato para evitar precipitaciones de sales y por último se almacena paraformaldehído al 2%.

5.5 Electroporación como técnica de transfección.

Los electrodos se elaboraron con alambre de tungsteno (Good fellow, Inglaterra) y se afilaron con nitrato de sodio caliente acercando un extremo del alambre al nitrato de sodio (JT Baker, México) derretido. El extremo no afilado se soldó a la terminal del electrodo. Por último el electrodo negativo se aisló poniendo barniz de uñas en la punta. La mesa de trabajo, pinzas y aguja para microinyectar se limpiaron rociando alcohol en su superficie. Se cortó un pedazo pequeño de parafilm (USA) y se colocaron sobre éste 2 microlitros de plásmido (2microgramos/microlitro) obtenido de una maxiprep (Quiagen, Alemania) y se mezcló con 0.4 microlitros de aceite mineral (Nujol, México). Se mezclaron los tres componentes y se subió el contenido a la aguja de microinyección limpia con la ayuda de una bomba. La aguja se acopló a un microinyector (WPI) que expulsa, de forma controlada pequeñas gotas de la mezcla de plásmido/tinta-china/aceite mineral. Se microinyectó el autópodo del brote de la extremidad de embriones de

pollo en estadios de 19 hasta el 30. Se colocó el electrodo negativo al centro del autómodo y de colocó el positivo sin aislar, en la región central cercano a la región donde quedó el colorante y en la mayoría de los casos en la región anterior de la pata. Se aplicó un voltaje de 27V y una frecuencia de 70 milisegundos. Una vez que los electrodos dejaron de funcionar se limpiaron con alcohol al 70% y el positivo se flameó para limpiarlo de los restos de óxido que pudiera tener.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Resultados.

6.1 Patrones de expresión *Tgfβ 2*, *Alk5*, *Smad3* y *Betaglicano* durante el desarrollo de la extremidad de pollo.

Con el fin de conocer los patrones de expresión de *Tgfβ2*, *Alk5*, *Smad3* y *Betaglicano* durante el desarrollo de la extremidad, se utilizó la técnica de hibridación in situ (HIS). El *Tgfβ2*, en la etapa 22, se observa en la parte anterior (flecha roja) y posterior (flecha azul) de la extremidad (Fig. 21A) mientras que en estadio 25 en la parte distal de los radios digitales (Fig. 21B). En el estadio 26 (Fig. 21C), la expresión se extiende también a la parte proximal de los mismos. En estadios posteriores 30 HH se observa en los tendones digitales (punta de flecha roja) (Fig. 21D) y para el estadio 31 (Fig. 21E) se observa en articulaciones (punta de flecha verde), tendones (punta de flecha roja) y en la punta de los dedos (punta de flecha amarilla).

En lo que respecta al *Betaglicano*, éste se expresa (estadio 20 HH) en la zona de progreso de la pata (Fig. 21F). En el estadio E23, (Fig. 21G) se presenta expresión en el pericondrio. Mientras que el receptor *Alk 5* en los estadios 26 y 29 se observa en el pericondrio y el interdígito (Fig. 21H-1I). Incluso en el E31) se observa la expresión en las articulaciones y el interdígito (Fig. 21J).

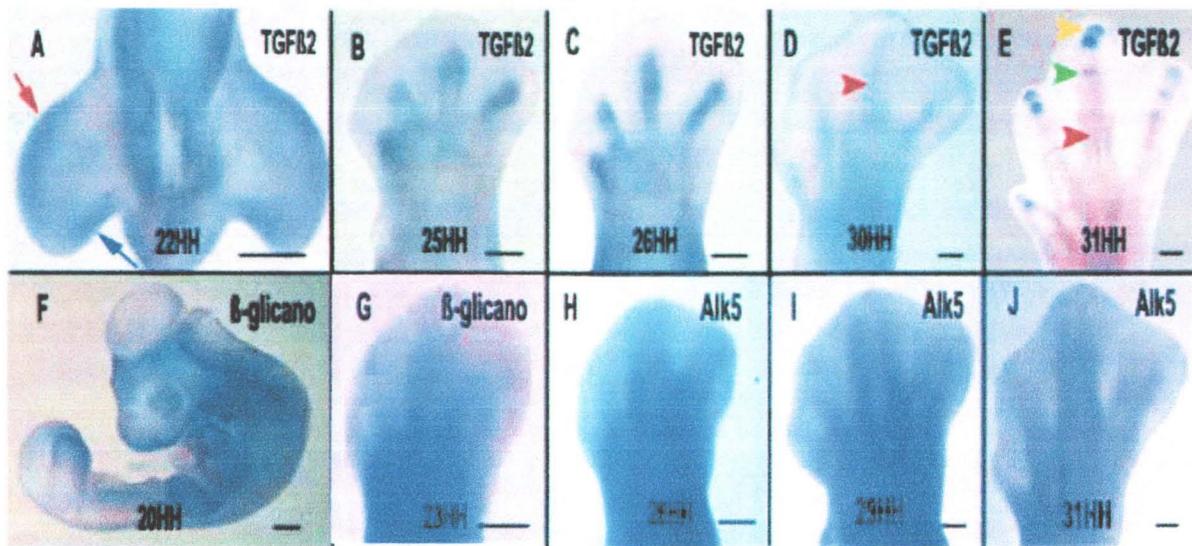


Figura 21.- Patrones de expresión de Tgfb2, β-glicano y Alk5. TGFβ2 se expresa en la parte anterior (flecha roja) como la posterior (flecha azul) de las extremidades posteriores en estadio 22 HH (Fig. 21A). En el estadio 25HH se expresa en la parte distal de los dedos (Panel B). En el estadio 26 HH se muestra expresión en todo el radio cartilaginoso de los dedos (Panel C), los tendones (punta de flecha roja) en estadio 30 HH (parte D y E de la figura 21), articulaciones (punta de flecha verde) y puntas de los dedos (punta de flecha amarilla) en estadio 31 (panel E). En la figura F se muestra la expresión de β-glicano en la zona de progreso de las extremidades de un embrión completo en estadio 20 HH y en el pericondrio en estadio 23 (Fig. 25 G). Alk5 se expresa en el pericondrio en los estadios 26, 29 y 31 HH (fig 25 H-J) e interdígito en los estadios 26 y 29 HH (Fig. H-I) e incluso en articulaciones e interdígito estadio 31 HH (panel J). Los paneles tienen escala de 250 μm a excepción del panel G, el cual tiene 150 μm.

Por otro lado, *Smad3* se expresa en 20 HH en una región de las somitas que podría corresponder al sindetomo (Fig. 22A). En 22-24 HH, este gen se expresa en el ectodermo dorsal de la extremidad (flecha café) (Fig. 22B-C) y en la AER (flecha naranja) (Fig. 22D). En las etapas que corresponden a la formación de los dedos, se observa la expresión de *Smad3* en los radios digitales cartilagosos (punta de flecha naranja) (Fig. 22E-F) y finalmente en los blastemas tendinosos (punta de flecha roja) (Fig. 22G-H).

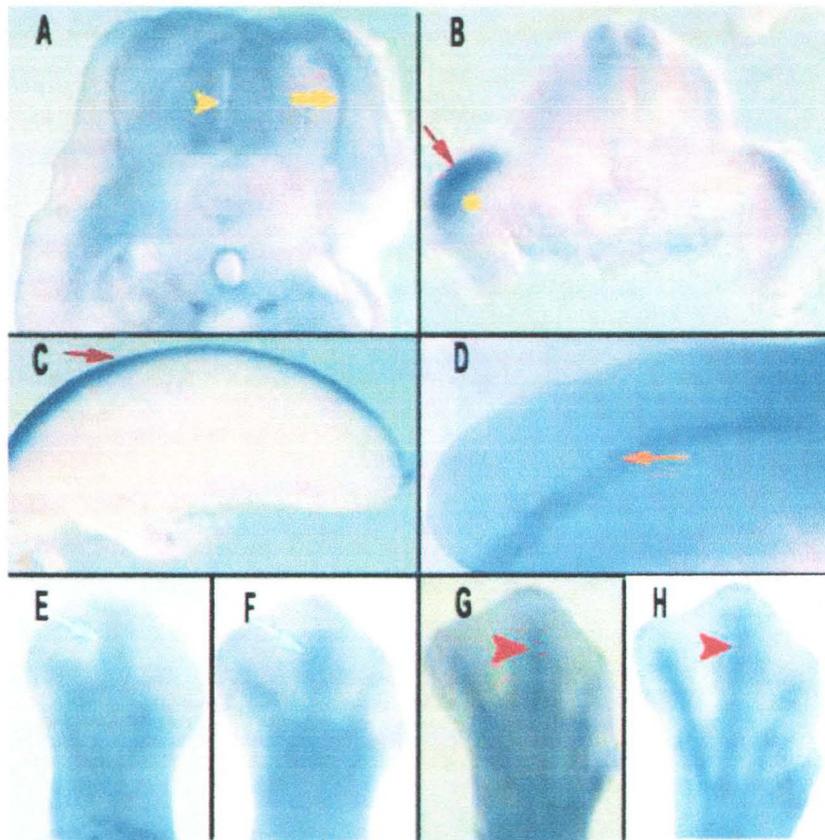


Figura 22.- Patrón de expresión de Smad 3 en el pollo. Se muestra la expresión de Smad 3 en el tubo neural (punta de flecha amarilla) y el sindetomo (flecha amarilla) (A). En B se presenta expresión en el ectodermo dorsal (flecha café) de ambas extremidades en un corte transversal de un embrión de pollo en etapa HH 20 (asterisco amarillo) y en corte sagital de un primordio en etapa 23HH (C). Además se observa expresión en la AER (flecha naranja) (D), en el cartilago en formación (E y F) en los estadios HH 25 y 27 respectivamente (flecha azul claro) y se concentra en los estadios 30 HH y 31 HH en los blastemas tendinosos (G y H) (punta de flecha roja).

6.2 TGF β induce acortamiento de la extremidad y cambios en la identidad de los dedos.

Con la finalidad de conocer las funciones de *Tgf β* en la extremidad, se aplicó TGF β 1 con la implantación de una perla de heparina en la parte central de la extremidad de pollo a 20 embriones en estadio 25 (flecha verde). Después de 48 horas de tratamiento se observó una disminución en la longitud tanto del autópodio como del zeugópodo en 5 de ellos (Fig. 23A). En otros casos, se observó que los elementos posteriores desaparecieron, esto último ocurrió cuando la perla (flecha roja) que con la proteína adsorbida quedaba colocada hacia la región posterior de la extremidad, más que hacia el centro. Con la idea de aclarar este punto se aplicó una perla de TGF β (200 ng/ml) en la región posterior distal de la extremidad de embriones en estadio 26 y con 127 horas de tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron 30 fenotipos en los que se observa la desaparición de dedos posteriores y un cambio de identidad en los dedos posteriores hacia dedos anteriores parecidos a dedos 1. En el panel B se muestra la transformación de los dedos III y IV en dedos I (marcados con asterisco negro) (Figs. 23B-23C) comparados con sus controles mostrados en D y E respectivamente.

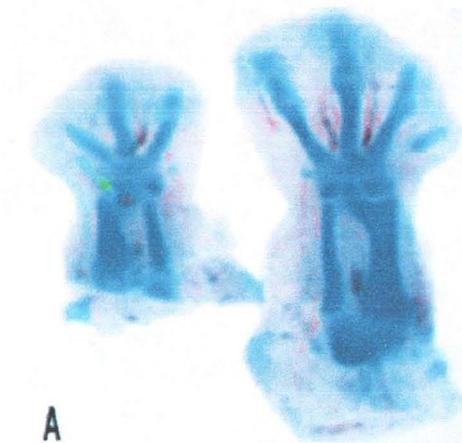
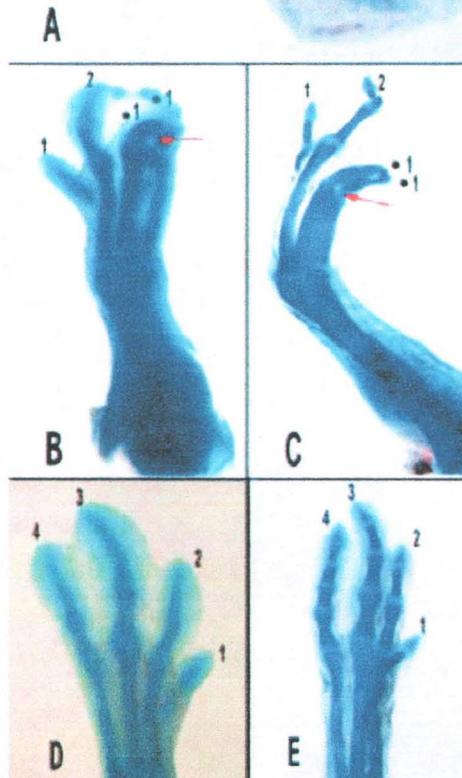


Figura 23.- Aplicación de TGF β 1 en la parte central y posterior de la extremidad. Después de 48 horas de aplicar una perla en la parte central de la extremidad con TGF β 1(50 μ g/ μ l) (flecha verde) ocurre un acortamiento de la extremidad tanto del autópodo como del zeugópodo (panel A izquierda). Al colocar una perla con TGF β 1 (200 ng/ml) en la parte posterior de la extremidad de pollo en estadio 26 y 127 horas de tratamiento ocurren cambios de identidad de los dígitos observados como dos fenotipos (Fig 27 B-C) (la perla es la indicada con flecha roja). En el panel D se muestra el control del panel B, mientras que en E el control de C.



6.3 El bloqueo de la función de TGF β en la región anterior de la extremidad genera la pérdida de dedos y cambio de identidad.

Con la finalidad de evaluar la función de *Tgf β* se bloqueó la vía de transducción de dicho factor. La molécula *Smad3* es una de las transductoras de la señal para el *Tgf β* , por ello, que en este estudio se bloqueó su función al electroporar la forma truncada de *Smad3* (Δ *Smad3*) para determinar el efecto en el desarrollo de la extremidad. En estadios tempranos del desarrollo del pollo bajo este tratamiento

se muestran fenotipos variados resultantes de un total de 16 que se agrupan de la manera siguiente; 1) pérdida en la identidad de los dedos (esto es los dedos son todos parecidos y están marcados con signo de interrogación por no tener identidad comparados con su control en el panel A) (Fig. 24A y 24B), 2) retraso en la formación de los cartílagos (Fig. 24C y 24D), 3) fusión de tarsos (Fig. 24E-H) y 4) pérdida de elementos esqueléticos (se indica la posición de la pérdida del dedo I en la flecha violeta) (Fig 24I-K), 5) fusión de articulaciones (Fig. 24I) y 6) retraso en la osificación endocondral (Fig. 24L-M). En todos los casos se observó reducción en el tamaño de la extremidad desde muy severo (Fig 24B) hasta moderado (Fig 24L). En la figura 24A y 24B se muestra un experimento en el que el embrión de pollo fue electroporado en el estadio 22 y después de 72 horas de tratamiento, se observó la pérdida de la identidad de los dedos (compárese Fig 24A con 24B). En el estadio 23 con 72 horas post- tratamiento también se presenta reducción en el tamaño del autópodo (figura 24D).

De manera interesante, se observa la aceleración en la hipertrofia de los condrocitos en proliferación de la tibia, por lo que se observa una reducción en la zona de formación de cartílago y una reducción en el tamaño de la fíbula (Figura 24L abajo). El acercamiento de estas figuras se observa en la figura 24M. Este resultado puede sugerir que la reducción en el tamaño de los elementos esqueléticos se puede explicar por la falta de proliferación de los condrocitos y su rápido paso hacia condrocitos hipertróficos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

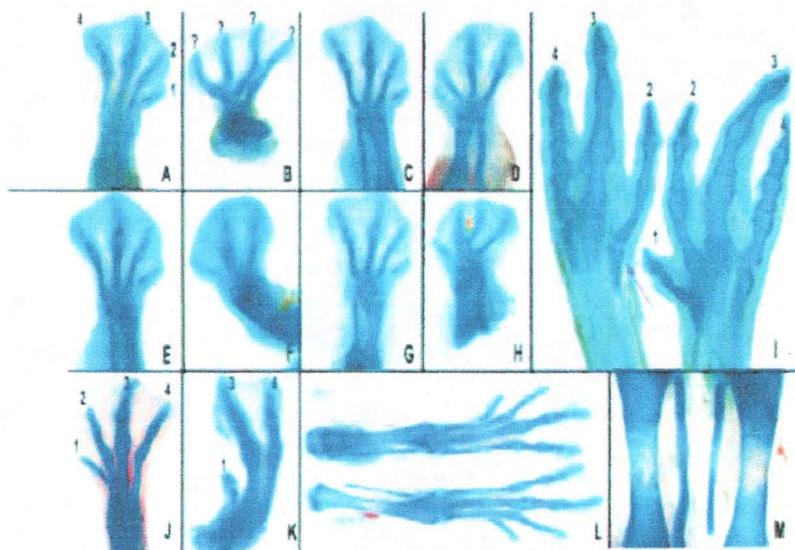


Figura 24.- Función de Smad 3 en el desarrollo de la extremidad. Se muestran los fenotipos obtenidos a distintos estadios después de la transfección de Smad 3 en su forma truncada (Δ Smad 3). La transfección se realizó en el estadio HHH 22 y después 72 horas después se observa la pérdida de identidad de los dedos, fusión de metatarsales, así como reducción en el tamaño del autopodo (B) con respecto del control (A). En el estadio 23+72 horas post-transfección se presenta reducción en el tamaño del autopodo en (D) comparado con su control (C), lo mismo ocurre en la pata experimental transfectada en el estadio 22+72 horas posttransfección observada en F comparada con su control, que se presenta en E. En H se presenta una fusión de falanges y reducción en el tamaño del autopodo en el estadio 28+48 horas post transfección y su control se presenta en (G). En el estadio 25+192 horas se observa la pérdida del dedo 1 (el lugar donde debería encontrarse el dedo 1 (se indica con una flecha violeta) (panel I a la izquierda) comparado con su control (panel I derecho). En el estadio 30+72 horas posttransfección se observa la pérdida del dedo 2 y una posición ectópica del dedo 1 al electroporar con Δ Smad 3 la parte anterior (K) mientras que su control se observa en (J). En el estadio 23 se observa una aceleración en la hipertrofia de la placa de crecimiento de la tibia y un acortamiento de la fibula (a simple vista) (L, abajo) y su amplificación en (M, derecha) y el detalle del control donde se muestra la reducción en el tamaño de la fibula y en la hipertrofia de la tibia (observada como una disminución en el área azul de cartilago y un aumento en el área blanca de hueso) (M Izquierda).

Otro resultado observado durante el bloqueo de la señalización de $Tgf\beta$ es el truncamiento de dedos (Fig. 25A) y la presencia de muerte celular (observada en una tinción con rojo neutro vista como gránulos positivos al colorante en el estadio 25 con 24 horas de tratamiento (Fig 25B), además de un truncamiento general de la extremidad anterior transfectada (datos no mostrados).

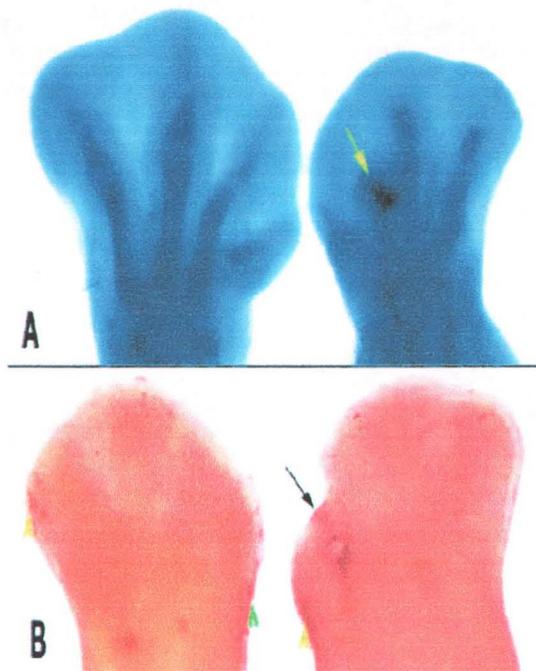


Figura 25.- Truncamiento y muerte interdigital después de la electroporación del dominante negativo de *Smad3*. Al electroporar con el dominante negativo de *Smad3* se observa el truncamiento de uno de sus dedos en el sitio de la transfección (flecha amarilla) en un embrión de estadio 26 HH y 48 horas de tratamiento (panel A derecha) comparado con su control (panel A izquierda). En la figura B derecha se observa a la izquierda una muesca en la parte de la pata electroporada (resultado de la muerte celular después de la electroporación) que es indicativa de células muertas (flecha negra) y presencia de células positivas a la tinción de rojo neutro además de las presentes en la zona necrótica anterior en un embrión de estadio 25 y 24 horas de tratamiento a la izquierda se presenta su control con presencia de células muertas en la zona necrótica anterior (punta de flecha amarilla) y posterior (punta de flecha verde).

6.4 La señalización de $TGF\beta$ es importante para el desarrollo del tendón.

El patrón de expresión de *Smad3* sugiere una posible participación de la señalización de *Tgf\beta* en el desarrollo del tendón. Es por ello que con el fin de conocer cuál es la participación de *Tgf\beta* en la formación de los tendones, primero se realizaron cortes histológicos de extremidades en varias etapas del desarrollo (Fig. 19-20) para compararlos con los resultados. Se realizaron experimentos de pérdida de función de *Tgf\beta* con betaglicano soluble y con la electroporación de $\Delta Smad3$, interrumpiendo la vía de transducción de *Tgf\beta* y como resultado se observa la disminución del tamaño del tendón. En donde el control (panel C) se observa en el recuadro verde mientras que el experimental en el recuadro azul (panel D). (Fig. 26A-D). Mientras que en la figura 26E-F se muestra la inhibición del crecimiento del tendón después de aplicar una perla con betaglicano soluble ([0.884 $\mu g/\mu l$]), co-receptor de *Tgf\beta*, que inhibe la transducción de la vía de *Tgf\beta* al secuestrar al ligando y no permitir la unión de éste a su receptor. Aunque éste resultado deberá confirmarse con la inmunohistoquímica de alguno de los

marcadores característicos del tendón como *Tenacina* o *Colágena III* y conocer que moléculas están perdiéndose después del bloqueo de la señalización de $TGF\beta$.

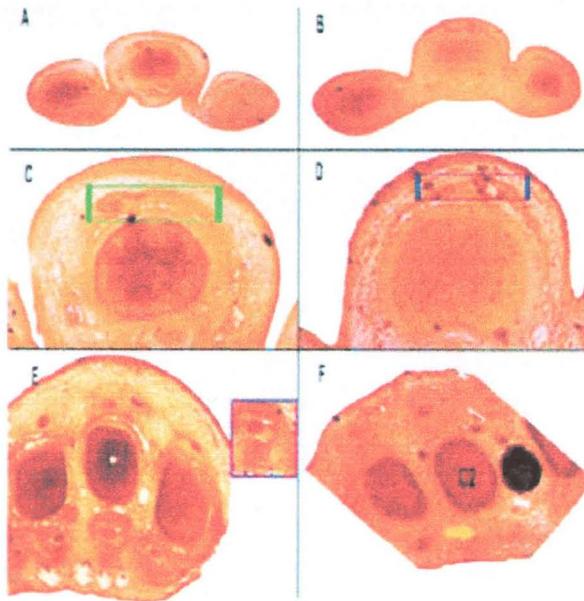


Figura 26.- Participación de $Tgf\beta$ en la formación del tendón. En la fig. 26B se muestra una pata embrion de pollo de 8 días (34 HH) teñida con la técnica de metenamina-plata (con el fin de visualizar los tendones), electroporada con la forma truncada de Smad3. El detalle en el panel B se muestra en la parte D. Si se compara con la figura 26C (recuadro verde), el detalle de su control (Fig. 26A). Se observa una disminución en el tamaño del tendón observado a detalle en la figura D (recuadro azul). La interrupción de la vía de transducción de $Tgf\beta$ con la electroporación de la forma truncada de Smad 3 (Smad3 Δ) interfiere en la formación de un tendón normal. En un experimento análogo se coloca una perla con β -glicano (en negro) en el dedo 2 (panel F) (marcado como C2) y como resultado no se forma el tendón ventral del dedo 2 (Flecha amarilla). Compárese con su control (panel E) en el que se muestra un recuadro del tamaño del tendón del dedo dos sin manipulaciones (recuadro violeta).

7. Discusión.

En esta tesis se observó que *Tgfb2* en estadios tempranos se expresa en la parte anterior y posterior de la extremidad, mientras que *Smad3* en la AER y en el ectodermo dorsal, sugiriendo un papel de *Tgfb* en el control del crecimiento próximo-distal y en la polaridad dorso ventral. La expresión del receptor *Alk5* no fue muy localizada en estos sitios, más bien parece una expresión ubicua. La expresión de los componentes de la señalización de TGF β en el pericondrio, las articulaciones de los dedos y en el interdígito la extremidad, también sugiere un papel en estos procesos. Así tenemos que probablemente *Tgfb2* a través de *Alk5* y *Smad3* participen en la diferenciación del cartílago, y las articulaciones. Como se evidencia en los resultados en los que hay fusión de articulaciones y pérdida de elementos esqueléticos al bloquear la función de la señalización de *Tgfb*.

La expresión de *Alk 5* en el interdígito sugiere que la señalización de *Tgfb* está participando en la muerte interdigital, como se ha demostrado con el ratón mutante de *Tgfb* $2^{-/-}$ y $3^{-/-}$, en el que se producen sindactilias (Dunker et al, 2002) Sin embargo, la inducción de dedos ectópicos en el interdígito con *Tgfb* es contradictorio a estos resultados (Chimal-Monroy et al 2003). Una posible explicación podría ser que el efecto de los TGF β sobre el interdígito para inducir muerte o condrogénesis dependa del estadio de desarrollo. Aunque hasta ahora no hay ningún estudio que explique esta discrepancia.

Se sugiere que la disminución del tamaño de la extremidad resultante de la electroporación con el dominante negativo de *Smad 3* es debido a una disminución de la proliferación y por la amplitud que tiene la porción de hueso con respecto a los controles. Ésta ampliación de la porción de hueso se debe a la aceleración de la hipertrofia de los condrocitos, con el rápido paso de cartílago a hueso sin que ocurra proliferación por lo que se presenta un fenómeno parecido a las condrodismplasias humanas como se reporta en los trabajos de Ferguson, 2004. O en los ratones nulos de *Tgfb-2* en el cual ocurre acortamiento de la extremidad a

nivel del zeugópodo lo que indica que esta molécula participa en la promoción del crecimiento cartilaginoso en la extremidad (Sanford et al 1997). Así mismo, los resultados de la fusión de tarsos y pérdida de elementos esqueléticos, sugiere una participación de miembros de *Tgfβ* en distintos pasos de la diferenciación del cartílago. Con la electroporación del dominante negativo de *Smad3* se pierde el dedo 1. Esto sugiere que la señalización de *Tgfβ* a través de *Smad3*, o bien participa en la identidad de los dedos anteriores o bien que al expresarse muy temprano en los primordios de los cartílagos controle el inicio o continuación de la condrogénesis y que solo afecte al dedo uno sea una consecuencia de bloquear la señalización en la región anterior.

Observamos que la aplicación de TGFβ en la parte posterior distal de la extremidad, observada en la figura 23B y 23C, produce cambio de identidad de los dedos. Sugerimos una hipótesis similar a la postulada por Sanz-Ezquerro y Tickle (2003) acerca de la disminución en los niveles de *Fgf* en la AER que lleva a la formación de la última falange y por lo tanto ocurre un cambio en la identidad de los dedos. Aun es necesario saber cual es el mecanismo molecular por medio del cual se forma el número de falanges característico de cada dedo que posiblemente involucre la señal de Wnt 14 y de la vía de la molécula Indian hedgehog (*Ihh*) molécula emparentada con *Shh*.

Otra hipótesis para explicar el cambio de identidad está relacionada con un aumento en los niveles de *Tbx2* y *Tbx3*, que depende de la señalización de BMP. A consecuencia del bloqueo de la señal de *Bmp* los dedos mas posteriores (3 y 4) se anteriorizan transformandose el dedo 2 en dedo 1. En la presente tesis encontramos que tras la aplicación de TGFβ ocurren cambios en la identidad de los dedos. Sugerimos que TGFβ induce la expresión de Gremlin, un antagonista de BMP, que entonces bloqueará la función de las BMP, los genes *Tbx* disminuyen su expresión y entonces ocurren cambios en la identidad de los dedos (Susuki et al, 2004). La hipótesis de la expresión de Gremlin después de la aplicación de TGFβ en la actualidad está siendo probada en nuestro laboratorio. Otro fenotipo obtenido al bloquear la función de TGFβ es el encontrado cuando la forma truncada de *Smad3* actúa en etapas anteriores a la formación de los dedos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aquí observamos un fenotipo en que se presenta pérdida de identidad de los dedos (ver la figura 24B). En nuestro estudio sugerimos otra hipótesis, en la que TGF β controla los niveles de GLI3 represor que contrarresta los efectos de Shh en el establecimiento de la identidad de los dedos. Se ha demostrado la participación de GLI3 en el establecimiento de la identidad de los dedos (Zeller, 2004; Chen, et al; 2004)

En lo que respecta a la formación de los tendones, los patrones de expresión de *Tgfb* y *Smad3* sugieren que puede existir alguna relación entre la activación de la vía de *Tgfb* mediada por *Smad3* y la formación de los tendones, ya que sugerimos que ésta última está relacionada con la activación de una población progenitora del mesénquima y en particular del tejido tendinoso (Brent et al 2003). Los experimentos de pérdida de función de *Tgfb* mediada por *Smad3* confirman que existe una participación de ésta última molécula en la formación del tendón, aunque todavía se desconoce si la señalización por Tgfb controla el inicio de la formación de los tendones o el mantenimiento de los mismos, para lo cual es necesario evaluar la expresión de *scleraxis*, que se ha postulado como el gen más temprano que se expresa en los progenitores de los tendones.

Es de resaltar que la expresión de *Smad 3* en las somitas que posiblemente corresponden con el sindetomo coincide con su expresión en los tendones. Además, la expresión de *Tgfb 2* en los tendones sugiere que esta molécula podría estar dirigiendo el desarrollo de estos a través de *Smad 3*. Experimentos de bloqueo de la vía de transducción de *Tgfb* con el correceptor betaglicano soluble y con la transfección de la forma truncada de SMAD 3, indican que *Smad 3* está dirigiendo el desarrollo del tendón, ya que bajo este tratamiento no hay desarrollo de este último. Aun falta por conocer si *Smad 3* está permitiendo el desarrollo de los tendones *per se* o está participando en la interacción músculo-tendón, por lo que es necesario conocer la señalización tendón-músculo.

8. Conclusiones.

El *Tgfβ* participa en funciones importantes relacionadas con la diferenciación de los condrocitos o en la inhibición de su proliferación, puesto que la aplicación de *TGFβ* exógeno en el centro del autópodo produce acortamiento de la extremidad o bien pérdida de dedos. El cambio en la identidad de los dedos después de la aplicación de *TGFβ* exógeno en la parte posterior de la extremidad sugiere una participación de esta última molécula en el establecimiento de identidad de los dedos, aunque todavía no se conoce el mecanismo por medio del cual este factor produce dicho cambio. Los experimentos de pérdida de función realizados con la forma truncada de SMAD 3 no generan un resultado concluyente porque *Smad3* transduce también la vía de *Activinas* además de *Tgfβ*, por lo que la participación de *Smad3* en la formación de tarsos y articulaciones así como en la pérdida de identidad digital, en la muerte interdigital y la formación de elementos esqueléticos anteriores también se puede atribuir a la participación de las activinas. Se puede concluir que la señalización de *TGFβ*-*Activinas* mediada por *Smad 3* está involucrada en la formación de los tendones digitales aunque no se conoce si está participando en su establecimiento o en su mantenimiento.

9. Perspectivas.

Debido a que *Smad 2* también está participando en la vía de transducción de *Tgf β -Activinas*, será necesario evaluar el papel de ésta primera molécula para saber que vía de transducción regula la formación de dedos anteriores, diferenciación de condrocitos, establecimiento de la identidad, formación de tarsos y articulaciones.

Para conocer el establecimiento de la identidad anterior postula la posible participación de TGF β en la activación de *Gremlin* y *Tbx*. En trabajos posteriores se comprobaría la participación de estas moléculas en la regulación de Gremlin frente a la aplicación de TGF β . El control en los niveles de GLI3 represor por lo que deberá evaluarse la conversión de GLI3 activador en GLI3 represor así como la regulación de *Fgf* para la formación de la última falange (Sanz-Ezquerro y Tickle, 2003).

Para comprobar la participación de la señalización de *Tgf β* como factor de sobrevivencia, deberán hacerse experimentos de ganancia de función y hacer detección de muerte celular con colorantes vitales como el rojo neutro o con la prueba de TUNEL

Una vez que se ha conocido la participación de *Smad3* en la formación del tendón podrían realizarse trabajos posteriores para conocer las moléculas involucradas en etapas tempranas como *Scleraxis* después de la aplicación de *Smad3*. Actualmente se están desarrollando investigaciones para conocer las interacciones del tendón con el músculo, aunque en su mayor parte están enfocados al establecimiento temprano de esta relación tendón-músculo con la evaluación de genes como *Scleraxis*

I. Apéndice.

I. 1 Preparación de la ribosonda.

Se realiza el corte del plásmido con la enzima de restricción que convenga según el mapa de la construcción del plásmido. La concentración del plásmido debe de estar a 1 µg/ml debe realizarse una reacción de por lo menos 50 µl y agregarse 22.5 µl de agua estéril 5 µl de amortiguador de la enzima, 20 µl de plásmido, 2.5 µl de la enzima (10 U/µl) e incubarse 2 h a 37° C. Después deberá comprobarse la linearización con un gel de electroforésis en el cual se cargaran 2 µl de plásmido digerido y en otro carril 1 µl de plásmido sin digerir. En el carril que tiene el plásmido digerido deberá observarse una banda que corresponde al plásmido linearizado en cambio en el otro carril se observarán múltiples bandas que corresponderán a las conformaciones del plásmido completo. En caso de que no se haya digerido se puede dejar toda la noche o se agregará más enzima. Al cabo de que la linearización se complete se procederá a precipitar el plásmido linearizado agregando 150 µl de etanol absoluto y se deja precipitar por 2 horas a temperatura ambiente o 0.5 horas a -70 °C. Después se centrifuga a 14,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se retira el sobrenadante y se agrega 1ml de alcohol 70° para después centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se retira el sobrenadante, se deja secar 20 minutos y se agregan 7 µl de agua estéril.

Después se iniciará la transcripción, para ello se agregarán 4 µl de amortiguador de la enzima de transcripción 5X, 3.6 µl de los nucleótidos adenina+citosina+guanina (10mM) 1 µl de DTT (100 mM), 1.6 µl de UTP (6.5 mM), 0.8 µl de Dig UTP (3.5 mM), 7 µl de plásmido linearizado, 1 µl de polimerasa (T3, T7 o SP6 10U µl /) e incubar 2 horas a 37°C

Después se precipita la ribosonda con 3 µl de tRNA (10 mg/ml), 200 µl de TE (pH8), 4 µl de acetato de amonio 5 M y 300 µl de etanol absoluto frío (-20°C), se deja precipitar toda la noche a -20°C, se centrifuga 20 min a 12,000 rpm. Se retira el sobrenadante y se deja secar por 8 minutos (no secar demasiado). Se agregan 30 µl de agua DPEC y se almacena a -20°C.

Se comprueba la transcripción de la ribosonda corriendo una electroforésis con 1 μ l del transcrito y en otro carril 2 μ l del plásmido no digerido

Para comprobar la incorporación de la digoxigenina en la ribosonda se hace una prueba llamada dot-blot (Dig Quantification Teststrips; Roche, Alemania). El procedimiento es el siguiente: Se pone un microlitro de la sonda en la tira experimental, se deja secar y se pone otro microlitro. Se agregan 300 μ l de la solución de bloqueo tanto en la tira control como en la experimental e incubar 2 minutos. Preparar una dilución 1:200 de antidigoxigenina –AP en la solución de bloqueo al 10% por 3 minutos. Lavar con TBST por un minuto. Lavar durante 1 minuto con amortiguador de detección (Tris-HCl, Na Cl 0.1 M pH 9.5). Poner 200 μ l de BM-purple en la obscuridad durante 15-30 minutos. Cuando se haya revelado se lava con agua destilada .

I.2 Tinción de esqueleto. (Hueso y cartílago).

Los embriones grandes (>estadio 30 HH) se desviceran y a los más grandes (estadio 34 HH) se les quita la piel, se lavan bien con PBS y se dejan en alcohol 96% por una noche, al día siguiente se cambia el alcohol por acetona y se deja una noche en agitación ligera. En seguida se pasa el embrión a una solución de azul alciano-alizarina roja dejarlos en agitación (también se pueden dejar a 37°C pero se acelera la reacción). Se lavan 3 veces con agua destilada y enseguida se aclaran los embriones con una solución de hidróxido de potasio al 1% en glicerol al 20 %. Revisar la reacción, esta puede transcurrir desde algunas horas hasta una noche, en caso de que la reacción este completada en el punto que se requiera se detendrá con una solución 50%/50% de glicerol-PBS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I.3 Detección de muerte celular con la tinción de rojo neutro.

La pata a teñirse se lava con PBS, se cambia a PBS limpio y se agregan de 2 a 3 gotas de la solución de rojo neutro y se mezcla. Dejar que prosiga la tinción hasta tener un rojo encendido, principalmente en el interdígito. Después de obtenida la tinción deseada se lava con PBS y se fija de inmediato en formol cálcico toda la noche. Se lava con isopropanol dos veces por espacio de una hora cada vez. Se agrega xilol en cantidad suficiente y allí se almacena. Se recomienda tomar fotografías el mismo día que se transparenten ya que la tinción se pierde con el tiempo que se mantengan en xilol.

I.4 Preparación de perlas de heparina.

Las perlas se almacenan a 4°C, y se colocan sobre una cámara húmeda que consistirá en un trozo de parafilm colocado sobre una caja de Petri de plástico cerrada rodeada con unas gotas de PBS y sellada con parafilm. Al momento de utilizarlas se elimina por capilaridad el PBS que contienen. Se agregarán 2 μ del factor de crecimiento que se utilice y se dejan incubar por alrededor de 2 horas. Se conservarán en hielo.

II. Soluciones.

PBS pH 7.4 (Buffer de Fosfatos Salino, pH 7.4)

Agregar:

	1 X
NaCl (JT- Baker México)	
KCl (JT Baker México)	0.2 g
Na₂HPO₄ (JT Baker México)	1.44 g
KH₂PO₄ (JT Baker México)	0.24 g
Agua bidestilada	800 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl.

Aforar a 1 lt con Agua bidestilada.

Esterilizar en la autoclave.

PFA 4 % (Paraformaldehido al 4 %)

	100 ml
Agua desionizada	80 ml
Paraformaldehido (Sigma, México)	4 g
NaOH 10 N (JT- Baker, México)	6 ml
PBS 10 X	10 ml

Filtrar (filtro Watman)

Aforar a 100 ml con agua desionizada

Aclarar la solución con NaOH , alícuotar y almacenar a -20°C.

PBT PBS-Tween 20 0.1 %. (Tween 20 Research Organics, USA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SSC 20 X (Buffer de Citratos Salino Standard, pH 7.0, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$ 0.3M, NaCl 3M) Dejar reposar toda la noche. Esterilizar en la autoclave.

SDS 10 % (Dodecil Sulfato de Sodio (JT Baker, México) 10 %)

NaCl 1M, 5M, 10 M (Cloruro de Sodio) JT-Baker, México.

Tris-HCl 1 M pH 7.5, 8, 9.

	100 ml
H₂O-DPEC	80 ml
Trizma base (ICN, USA)	12.1 g
HCl 1N (Ph)	Ajustar pH
H₂O-DPEC	Aforar

Filtrar y esterilizar.

KCl (Cloruro de Potasio) 1M, 5M, 10M.

MgCl₂ (Cloruro de Magnesio) 1M, 5M, 10M Sigma, México.

EDTA 0.5 M (Etilendiaminotetraacétato de sodio 0.5 M) Ph 8

	100 ml
EDTA (disódico) (Sigma, USA)	18.61 g
NaOH	2 g
Agua mili-Q	80 ml

Aforar con agua mili-Q.

RNA_t 10 mg/ml (Ácido Ribonucleico de transferencia)

Heparina 10 mg/ml

PK (Proteinasa K 10 mg/ml)

Levamisole 200 mM (SIGMA. USA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TBE (Buffer de Tris-Boratos y EDTA)

	1 X
Tris base	10.8 g
Ácido bórico	5.5 g
EDTA 0.5 M	4 ml
Agua bidestilada	Aforar a 1000 ml

TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM)

	100 ml
Tris-HCl 1 M pH 7.4	1 ml
EDTA 0.5 M	0.2 ml
H₂O-DEPC	80 ml
HCl 1N (Química Meyer, México)	pH 7.4
H₂O-DEPC	Aforar

Buffer de Carga TBE 5X (Para electroforesis)

	1 ml
Glicerol (JT-Baker, México)	0.5 ml
TBE 10 X	0.5 ml
Azul bromofenol	0.0025 g
Cianole Xileno	0.0025 g

Acetato de Sodio (NaCH₃COOH) 3 M, pH 5.2 ajustar el pH con ácido acético.

Acetato de Amonio (NH₄CH₃COOH) 5 M

NaOH (Hidróxido de Sodio) 1N, 5N y 10N

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HCl (Ácido Clorhídrico) 1N, 6N,y 12N

Medio LB (Medio Luria-Bertani: Triptona (Becton, USA)1%, Extracto de levadura (Becton-Difco, USA) 0.5%, NaCl 1%, pH 7)

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar.

Esterilizar en la autoclave.

Dejar enfriar la solución al menos hasta 55° C si se requiere agregar antibiótico.

Agregar antibiótico (50 μ g/ml de ampicilina o kanamicina).

Almacenar a temperatura ambiente o a 4° C.

Medio LB en Placas (Medio Luria-Bertani: Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7, 1.5 % bactoagar (Difco, USA)

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar.

Esterilizar en la autoclave.

Dejar enfriar la solución al menos hasta 55° C si se requiere agregar antibiótico.

Agregar antibiótico (50 μ g/ml de ampicilina o kanamicina).

Almacenar a temperatura ambiente o a 4° C.

H₂O₂ 6 %/PBT (Peróxido de hidrógeno al 6% en PBT) (H₂O₂ SIGMA,USA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PK (Proteinasa K 10 μ g/ml PBT)

PFA 4% + GTA 0.2% (Paraformaldehido 4% + Glutaraldehido 0.2%)

Buffer de Hibridación Formamida (Invitrogen, Reino Unido) 50%, SSC 5X, SDS 1%, RNAt 50 μ g/ml, Heparina 50 μ g/ml)

Solución I de hibridación (Formamida 50%, SSC 4X, SDS 1%)

Solución II de hibridación (NaCl 0.5M , Tris 10 mM pH 7.4, Tween-20 0.1%)

Solución III de hibridación (Formamida 50%, SSC 2X)

TBST+Levamisole 2 mM (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 10 mM, Triton 1%, Levamisole 2 mM)

NTMT+Levamisole 1 mM (Tris-HCl 50 mM pH 9.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 20 mM, Tween 20 1 %, Levamisole 1 mM)

Suero 10%/TBST+Lev (Suero de Oveja 10%/TBST-Levamisole 2 mM)

Anti-DIG-AP 1:2000 (anticuerpo Digoxigenina acoplado a Fosfatasa Alcalina en suero de oveja 10%/TBST-Levamisol.

BM-Purple (Sustrato de la fosfatasa alcalina, BM-Purple).

KOH 1%/Glicerol 20% (Hidróxido de Potasio 1% en Glicerol 20%)

Glicerol/PBS (Glicerol 50% en PBS 50%)

Azul alciano- alizarina roja

	100 ml
Azul Alciano 0.3%	5 ml
<i>AlizarinaRoja0.1%</i>	5 ml
<i>Ácido Acético</i>	5 ml
<i>EtOH 70%</i>	85 ml

KOH 3%/Glicerol 20% (Hidróxido de Potasio 3% en Glicerol 20%)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Azul Alciano 0.3%

Alizarina Roja 0.1%

KOH 10% (Hidróxido de Potasio 10%)

EtOH 70% (Etanol 70%)

Rojo neutro 2% en PBS.

Formol cálcico (CaCl₂ (cloruro de calcio)1% en formol 4%, pH 7)

Rojo neutro para tinción.

	3 ml
Rojo Neutro 2%	50 µl
PBS o (MEM)	3 ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Referencias.

- 1- Abarca-Buis René Fernando. 2002. Expresión de las Smads durante la morfogénesis de la extremidad de pollo y su papel en la condrogénesis. Tesis de licenciatura Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. 72pp.
- 2- Ahn S, Joyner AL. 2004. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 118:505-516.
- 3- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813-2828.
- 4- Ameye L, Aria D, Jepsen J, Oldberg A, Xu T, Young MF. 2002. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J* 16:6773-680.
- 5- Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. 2003. Development of synovial joint. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:144-55.
- 6- Archer CW, Morrison H, Pitsillides, AA. 1994. Cellular Aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage. *J Anat* 184:447-456.
- 7- Benjamin M, Ralphs JR. 2000. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* 196:85-130.
- 8- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85-89.
- 9- Birk DE, Nurminskaya MV, Zychband EI. 1995. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev Dyn* 202:229-243.
- 10- Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113:235-248.
- 11- Canty EG, Kadler KE. 2002. Collagen fibrill biosynthesis in tendon: a review and recent insights *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133:979-985.
- 12- Charité J, Mc Padden DG, Olsen ENN. 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.
- 13- Cheifetz S, Massagué J. 1991. Isoform-specific transforming growth factor- β bindings proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol specific phospholipasa C. *J Biol Chem* 266:20767-20772.
- 14- Chen H, Lun Y, Ovchinnikov D, Kokubo H, Oberg KC, Pepicelli CV, Gan L, Lee B, Johnson R L. 1998. Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella Syndrome. *Nature Genet* 19:51-55.
- 15- Chen P, Yu YM, Reddi AH. 1993. Chondrogenesis in chick limb bud mesodermal cells: reciprocal modulation by activin and inhibin. *Exp Cell Res* 206:119-127.
- 16- Chen Y, Knezevic V, Ervin V, Hutson R, Ward Y, Mackem S. 2004. Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development* 131:2339-2347.
- 17- Chimal-Monroy J, Rodríguez-León J, Montero JA, Gañan Y, Macias D, Merino R, Hurlé JM. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 257:292-301.
- 18- Craig FM, Bayliss MT, Bentley G, Archer CW. 1990. A role for hyaluronan in joint development. *J Anat* 171:17-23.
- 19- Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation and maintenance of chick limb development. *Cell* 84:127-136.
- 20- D'Souza D, Patel K. 1999. Involvement of long and short range signaling during early tendon development. *Anat Embryo* 200:367-375.

- 21- Dahn RD, Fallon JF. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. **Science** 289:438-441.
- 22- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. **J Cell Biol** 136:729-743.
- 23- De Crombrugge B, Horton WA, Olsen BR, Ramirez F. Eds. 1996. Molecular and Developmental Biology of the Cartilage. Conference proceedings. Bethesda, Maryland, USA. September 27-30, 1995. **Ann NY Acad Sci.** 785:1-367.
- 24- Dealy CN, Roth D, Ferrari AM, Brown C, Kosher RA. 1993. Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner that suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. **Mech Dev** 43:175-183.
- 25- Debrulle J, Pourquie O. 2003. Welcome to syndetome: a new somitic compartment. **Dev Cell** 4:611-612.
- 26- Dowthwaite GP, Edwards, J.C.W, Pitsillides, A.A. 1998. An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development. **J Histochem Cyto** 46:641-651.
- 27- Dreyer SD, Zhou G, Baldini A, Winterpacht A, Zabel B, Cole W, Johnson RL, Lee B. 1998. Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. **Nat Genet** 79:47-50.
- 28- Dudley AT, Ros MA, Tabin CJ. 2002. A re-examination of the progress zone model of proximodistal patterning of the developing limb. **Nature** 418:539-544.
- 29- Dunker N y Kriegelstein K. 2002. Tgfbeta 2-/-Tgfbeta 3-/- double knockout mice display severe midline fision defects and early embryonic lethality. **Anat Embryol (Berl)** 206(1-2):73-83.
- 30- Duprez D, Bell EJ, Richardson MK, Archer CW, Wolpert L, Brickell P, Francis-West PH. 1996. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. **Mech Dev** 57:145-157.
- 31- Edom-Vovard F, Bemondett S, Bonin MA, Teillet MA, Duprez D. 2002. FGF4 positively regulates Scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. **Dev Biol** 247:351-355.
- 32- Edom-Vovard F, Duyurez D. 2004. Signals Regulating tendon formation during chick embryonic development. **Dev Dyn** 229:449-457.
- 33- Edwards JC, Wilkinson LS, Jones HM, et al 1994. The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. **J Anat** 185:355-367.
- 34- Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, Birk DE. 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. **J Cell Biol** 151:779-788
- 35- Fallon JF, López A, Ros MA, Savage MP, Olwin BB, Simandl BK. 1994. FGF2: Apical ectodermal ridge growth signal for chick development of the tetrapod limb. **Science** 264:104-107.
- 36- Fell HB, Canti RG. 1934. Experiments on the development in vitro of the avian knee joint. **Proc Roy Soc London B** 116:316-351.
- 37- Ferguson, CM. Schwarz EM, Puzas JE, Zuscik MJ, Drissi H, O'Keefe RJ. 2004. Transforming growth factor-β1 induced alteration of skeletal morphogenesis in vivo. **J. Orthop Res** 22:687-696.
- 38- Fernandez-Teran M, Piedra M.E, Simandl B.K, Fallon, J.F and Ros MA. 1997. Limb initiation and development is normal in absence of the mesonephros. **Dev Biol** 189:246-255.
- 39- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. **Nature** 372:525-530.
- 40- Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten FP, Archer CW. 1999b. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. **Development** 126:1305-1315.
- 41- Francis-West PH, Parish J, Lee K, Archer CW. 1999a. BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. **Cell Tissue Res** 296:111-119.
- 42- Francis-West PH, Richardson MK, Brickell PM, Tickle C. 1994. Bone morphogenetic proteins and a signaling pathway that controls patterning in the developing chick limb. **Development.** 120:209-218.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- 43- Gañan Y, Macias D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurlle JM. 1996. Role of TGFβs 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.
- 44- Garciadiego-Cazares D, Rosales C, Katoh M, Chimal-Monroy J. 2004. Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by α5β1 integrin in the developing appendicular skeleton. **Development** 131:4735-4742.
- 45- Garciadiego-Cazares, David. 2005. La integrina α5β1 coordina la diferenciación del cartilago y la formación de articulaciones durante el desarrollo del esqueleto. Tesis Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 87pp
- 46- Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, Alexiou M, Garvey N, Silver LM, Papaioannou VE. 1996. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. **Mech Dev** 56:93-101.
- 47- Gilbert SF. 2003. *Developmental Biology*. 7a. ed. USA: Sinauer Associates. 838pp.
- 48- Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology*. 6a. ed. USA: Sinauer Associates. 749pp.
- 49- Gougos A, Letarte M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. **J Biol Chem** 265:8361-8364.
- 50- Grunenberg H, Lee AJ. 1973. The anatomy and development of brachypodism in the mouse. **J Embriol Exp Morphol** 30:119-141.
- 51- Hamburger V, Hamilton, HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* 195:231-272.
- 52- Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. **Cell** 118:517-528.
- 53- Hartmann C, Tabin CJ. 2001. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. **Cell** 104:341-351.
- 54- Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT 1999. Regulation and role of Sox in cartilage formation. *Dev. Dyn* 215:69-78.
- 55- Holder N. 1977. An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. **J Embriol Exp Morphol** 39:115-127.
- 56- Hongyan Z, Niswander L. 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. **Science** 272:738-741.
- 57- <http://rex.nci.nih.gov/Research/basic/lc/Abr303.htm>
- 58- Hurlle JM, Hinchliffe JR, Ros MA, Critchlow MA, Critchlow MA, Genis-Galv3ez JM. 1989. The extracellular matrix architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part of the developing chick limb: an ultrastructural, histochemical and immunocytochemical analysis. **Cell Differ Dev** 27:103-102.
- 59- Hurlle JM, Ros MA, Gañan Y, Macias D, Critchlow M, Hinchliffe JR. 1990. Experimental analysis of the role of ECM in the patterning of the distal tendons of the developing limb bud. **Cell Differ Dev** 30:97-108.
- 60- Iten LE. 1982. Pattern specification and pattern regulation in the embryonic chick limb bud. **Am Zool** 22:117-129.
- 61- Jiang TX, Yi JR, Ying SY, Chuong CM. 1993. Activin enhances chondrogenesis of limb bud cells: stimulation of precartilaginous mesenchymal condensations and expression of NCAM. **Dev Biol** 155:545-557.
- 62- Kalthoff K. 2001. *Analysis of biological development*. 2a edition. USA. Mc Graw-Hill. 790pp.
- 63- Krabbenhoft KM, Fallon JF. 1989. The formation of leg or wing specific structures by leg bud cells grafted to the wing bud is influenced by proximity to the apical ridge. **Dev Biol** 131:373-382.
- 64- Laufer E, Nelson C, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. 1994. Sonic hedgehog and FGF4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. **Cell** 79:993-1003.
- 65- Lefebvre V, Li P, de Crombrugge B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. **EMBO J** 17:5718-5733.

- 66- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. **Nature** 418:979-983.
- 67- Logan M, Simon HG, Tabin C. 1998. Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. **Development** 125:2825-2835.
- 68- López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. **Cell** 67:785-795.
- 69- López-Casillas F, Wrana JL, Massagué J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor. **Cell** 73:1435-1444.
- 70- López-Martínez, A. 1995. Limb patterning activity and resisted posterior localization of the amino terminal product of Sonic hedgehog cleavage. **Curr Biol** 5:791-796.
- 71- Macias D, Gañan Y, Sampath T, Piedra M, Ros M, Hurlle J. 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb. **Development** 124:1109-1117.
- 72- Mahmood R. 1995. A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb outgrowth. **Curr Biol** 5:797-806.
- 73- Massagué J. 1990. The transforming growth factor- beta family. **Annu Rev Cell Biol** 6:597-641.
- 74- Massagué J. 1998. TGF- β signal transduction. **Annu Rev Biochem** 67:753-791.
- 75- Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. **Nature** 374:356-359.
- 76- Merino R, Gañan Y, Macias D, Economides AN, Sampath KT, Hurlle JM. 1998. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGF, TGF β and noggin through BMP signaling. **Dev Biol** 200:35-45.
- 77- Merino R, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurlle JM. 1999. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. **Dev Biol** 206:35-45.
- 78- Merino R, Macías D, Gañan Y, Rodríguez-León J, Economides AN, Rodríguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC, Hurlle JM. 1999. Control of digit formation by activin signaling. **Development** 126:2161-2170.
- 79- Milenkovic L, Lapointe F, Le Douarin NM. 1999. Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning. **Development** 126:4431-4440.
- 80- Mittl PR, Priestle JP, Cox DA, Mc Master G, Cerletti N, Grutter MG. 1996. The crystal structure of TGF beta 3 and comparison to TGF beta: implications for receptor binding. **Protein Sci** 1996 5:1261-1271.
- 81- Niswander L, Jeffrey S, Martin GR, Tickle C. 1994. A positive feedback loop coordinates growth and pattern in the vertebrate limb. **Nature** 371: 609-612.
- 82- Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, Araga A, Ohata T, Ishimaru Y, Yoshioka H, Kuwana T, Nohno T, Yamasaki M, Itoh N, Noji S. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, apical ectodermal factor. **Development** 124:2235-2244.
- 83- Ohuchi H, Takeuchi J, Yoshioka H, Ishimaru Y, Ogura K, Takahashi N, Ogura T, Noji S. 1998. Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression
- 84- Oliver G, Wehr R, Jenkins NA, Copeland NG, Cheyett BN, Hartenstein V, Zipursky SL, Gruss P. 1995. Homeobox genes and connective tissue patterning. **Development** 121:693-705.
- 85- Otha M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massagué J. 1989. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. **Nature** 329:539-541.
- 86- Parr BA, Shea MJ, Vassileva G, McMahon AP. 1993. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in early embryonic CNS and limb buds. **Development** 119:247-261.
- 87- Pepin MC, Beauchemin M, Plamondon J, O'Connor-McCourt MD. 1994. Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor beta receptor type III by deletion mutagenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:6997-7001.
- 88- Perez AV, Perrine M, Brainard N, Vogel KG. 2003. Scleraxis (Scx) directs lacZ expression in tendon of transgenic mice. **Mech Dev** 120: 1153-1163.

- 89- Pitsillides AA, Archer CW, Prehm, P et al. 1995. Alterations in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation **J Histochem Cytochem** 43:263-273.
- 90- Riddle RD, Ensini M, Nelson C, Tsuchida, Tsuchida, T. Jessell T.M and Tabin, C 1995. induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *Wnt7a* establishes dorsoventral pattern in the pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83:631-640.
- 91- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75:1401-1416
- 92- Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. 2003. Smad3: A key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF- β . **Ann N Y Acad Sci** 995:1-10.
- 93- Rodríguez-Esteban C, Tsukui T, Yonei S, Magallon J, Tamura K, Izpisua Belmonte JC. 1999. T-box genes *Tbx4* y *Tbx5* regulate limb outgrowth and identity. **Nature** 398:814-818.
- 94- Ros MA, Rivero FB, Hinchliffe JR, Hurle JM. 1995. Immunohistological and ultrastructural study of the developing tendons of the avian foot. **Anat Embryol** 192:483-496.
- 95- Rowe DA, Fallon JF. 1982. The effect of removing posterior apical ectodermal ridge of the chick wing and leg on pattern formation. **J Embryol Exp Morphol** 65(suppl):309-325.
- 96- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGF- β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. **Development** 124:2659-2670.
- 97- Santesteban OE. 2001. Estudio del papel del ácido retinoico en la morfogénesis de los dedos. Tesis doctoral Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria. 145pp.
- 98- Sanz-Ezquerro JJ, Tickle C. 2003. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. **Curr Biol** 13:1830-1836.
- 99- Saunders JW Jr. 1948. The proximal-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. **J. Exp Zool** 108:363-404.
- 100- Saunders JW Jr. 1972. Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. **Ann N Y Acad Sci USA** 193:29-42.
- 101- Saunders JW, Cairns JM, Gasseling MT. 1957. The role of apical ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts of the chick. **J Morphol** 101:57-88.
- 102- Searls RL, Janners MY. 1971. The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. **Dev Biol** 24:198-213.
- 103- Segarini PR, Robert AB, Rosen DM, Seyedin SM. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor- β . **J Biol Chem** 262:14655-14662.
- 104- Segarini PR, Roberts AB, Rosen DM, Seyedin, SM. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 262:146-55
- 105- Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M. 2000. Sox9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TCG. **J Biol Chem** 275:10738-10744.
- 106- Settle SH Jr, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. 2003. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. **Dev Biol** 254:116-130.
- 107- Shi Y, Massagué, J Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. 2003. *Cell* 113:685-700.
- 108- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. 2001. The transcription factors *L-Sox5* and *Sox6* are essential for cartilage formation. **Dev Cell** 1:277-290.
- 109- Sporn MB, Roberts AB. 1990. TGF- β : Problems and prospects. **Cell Regul** 1:875-882.
- 110- Sporn MB, Roberts AB. 1992. Transforming growth factor- β : Recent progress and new challenges. **J Cell Biol** 119:1017-1021.
- 111- Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TFG beta-superfamily. **Nature** 368:639-643.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 112- Storm EE, Kingsley DM. 1999. GDF-5 coordinates bone and joint formation during digit. **Development** 209:11-27.
- 113- Summerbell D, Lewis JH, Wolpert, L 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244: 492-496.
- 114- Summerbell D, Lewis JH. 1975. Time, place and positional value in the chick limb bud. **J Embryol Exp Morphol** 332:6251-64360.
- 115- Summerbell D. 1974. A quantitative analysis of the effect excision of the AER from the chick limb bud. **J Embryol Exp Morphol** 32:651-660.
- 116- Sun X, Mariani, F.V. and Martin, G.M. 2002. Functions of FGF signaling from the apical ectodermal ridge in limb development. **Nature**. In press.
- 117- Suzuki T y Takeuchi, J. 2004. Tbx genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling 6;43-53.
- 118- Takeuchi JK. 1999. Tbx5 y Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. **Nature** 398:814-818.
- 119- te Welscher P, Zuñiga A, Kuijper S, Drenth T, Goedemans HJ, Meijlink F, Zeller R. 2002. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. **Science** 298:827-830.
- 120- Tickle C. 2003a. Patterning in vertebrate development. Oxford University Press. New York. 242pp.
- 121- Tickle C. 2003b. Patterning systems- from one end of the limb other. **Dev Cell** 4:449-458.
- 122- Todt WL, Fallon JF. 1987. Posterior apical ectodermal ridge removal in chick wing bud triggers a series of events resultings in defective anterior pattern. **Development** 101:505-515.
- 123- Vilchis-Landeros MM. 2002. Caracterización bioquímica del betaglicano soluble recombinante y su uso en el tratamiento de la glomerulonefritis experimental. Tesis doctorado en ciencias biomédicas. UNAM. 105pp.
- 124- Vogel A, Rodríguez C, Izpisua-Belmonte JC. 1996. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. **Development** 122:1737-1750.
- 125- Vogel A, Rodríguez C, Warnken W, Izpisua-Belmonte JC. 1995. Dorsal cell fate spacificied by chick Lmx 1 during vertebrate limb. **Development** 122:1737-1750.
- 126- Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. 1998. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. **Matrix Biol** 16:457-470.
- 127- Wang B, Fallon JF, Beachy PA. 2000. Hedgehog-regulated processing of GLI3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. **Cell** 100:423-434.
- 128- Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. 1991. Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. **Cell** 67:797-805.
- 129- Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V. 1997. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6 and 7, members of the TGF- β gene family. **J Clin Invest** 100:321-330.
- 130- Wolpert L, Beddigton R. Jessell T, Lawrence P, Meyerowits E, Smith J. 2002. Principles of development. Oxford University Press. New York 542pp
- 131- www.dms.dartmouth.edu/news/2002_h2/01oct2002_sporn.shtml
- 132- Xu PX, Cheng J, Epstein JA, Maas RL. 1997. Mouse Eya genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:11974-11979.
- 133- Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, Leder P, Deng C. 1998. Fibroblast growth factor receptor Z (FGFR2) mediated reciprocal regulatory loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. **Development** 125:753-765.
- 134- Yang Y, Drossopoulou G, Chuang PT, Duprez D, Marti E, Bumcrot D, Vargesson N, Clarke J, Niswander L, McMahan A, Tickle C. 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. **Development** 124:4393-4404.

- 135- Yang YZ, Niswander L. 1995. Interaction between signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: Dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* **80:939-947**.
- 136- Yigong S, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the Nucleus. *Cell* **113:685-700**
- 137- Yonei-Tamura S, Endo T, Yajima H, Ohuchi H, Ide H, Tamura K. 1999. FGF7 and FGF10 direct induce the apical ectodermal ridge in chick embryos. *Dev Biol* **211:133-143**.
- 138- Zeller R 2004. It takes time to take a pinky: Unexpected insights into how shh patterns vertebrate digits. *Sci STKE* 16:53.
- 139- Zhang D, Ferguson C, Regis J, O'Keefe J, Puzas JE, Rosier RN, Reynolds PR. 2002. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res* **17:293-3000**.
- 140- Zou H, Wieser R, Massagué J, Niswander L. 1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* **17:2191-2203**.
- 141- Zuñiga A, Haramis AP, McMahon AP, Zeller P. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF-4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401:598-602**.
- 142- Zwilling E. 1955. Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud. *J Exp Zool* **128:423-442**.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN