



Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Biotecnología

*Determinación de la duración del ciclo celular durante la  
formación de los dedos de la extremidad en desarrollo del  
ratón*

T E S I S

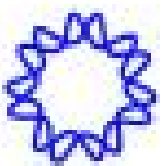
Que para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

**Q.F.B. Luz Adriana Vega Cabrera**

Director de Tesis

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles



Cuernavaca, Morelos, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*A mi familia:  
Sin ustedes nada de esto  
hubiera sido posible.  
Mi trabajo es para Ustedes.*

---

# *Agradecimientos.*

---

*Agradezco al Dr. Luis Covarrubias, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por todo el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis.*

*A todo el laboratorio "Covarrubias/Castro/Wood", en especial a la Dra. Rocío Hernández, por enseñarme todas las técnicas necesarias para sacar adelante este proyecto y por sus consejos; al Dr. Chris Wood, por su valiosa ayuda en las técnicas de microscopía; y a la M.C. Concepción Valencia, por todo su apoyo.*

*A la UNAM, al Instituto de Biotecnología y a todos mis compañeros y amigos de la Maestría. Me divertí mucho!*

*A mi comité tutorial, Dr. Enrique Salas Vidal y Dr. Joseph Dubrovski, por las aportaciones que enriquecieron este trabajo y tanto contribuyeron a mi formación académica.*

*A los miembros del jurado, Dr. Gustavo Pedraza Alva, Dra. Denhi Schnabel Peraza, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por sus comentarios y aportaciones a este escrito*

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio del Dr. Luis F. Covarrubias Robles, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Con el apoyo de CONACYT y PAPIIT (DGAPA IN225910).

---

# Índice

---

Índice de figuras	6
Introducción	7
<i>El embrión de ratón como modelo de estudio</i>	7
<i>Desarrollo de la extremidad</i>	7
<i>Moléculas involucradas en el desarrollo de la extremidad</i>	9
<i>Muerte celular programada y su importancia en el desarrollo</i>	11
<i>El ciclo celular</i>	12
<i>Marcadores de proliferación celular</i>	14
Antecedentes	16
<i>Morfogénesis y desarrollo de la extremidad en su eje próximo-distal</i>	16
<i>Morfogénesis y separación de los dedos</i>	18
<i>División celular en la extremidad</i>	20
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivos	23
Metodología	24
<i>Animales</i>	24
<i>Cultivo de las extremidades</i>	24
<i>Procesamiento de las extremidades después del cultivo</i>	24
<i>Detecciones inmunohistoquímicas</i>	
<i>Estimación del número de células en la región distal de los dedos en desarrollo</i>	25
<i>Curva de incorporación de IdU y CldU en diferentes concentraciones</i>	26
<i>Métodos de análisis de los parámetros del ciclo celular</i>	26
<i>Hibridación in situ de N-myc</i>	31
Resultados	32
<i>Estimación del número de células en la región distal de los dedos en desarrollo</i>	32
<i>Determinación de la población que se encuentra en proliferación activa en la extremidad en desarrollo</i>	33
<i>Determinación de la duración del ciclo celular, mediante la incorporación al</i>	

<i>DNA de los análogos de la timidina</i>	36
<i>Determinación de la duración del ciclo celular mediante el análisis de otros marcadores de proliferación</i>	40
<b>Discusión de los resultados</b>	<b>44</b>
<i>Estimación del número de células en la región distal de los dedos en desarrollo</i>	45
<i>Determinación de la población que se encuentra en proliferación activa en la extremidad en desarrollo</i>	45
<i>Determinación de la duración del ciclo celular, mediante la incorporación al DNA de los análogos de la timidina</i>	48
<i>Determinación de la duración del ciclo celular mediante el análisis de otros marcadores de proliferación</i>	50
<i>Análisis y comparación de los distintos métodos empleados para la determinación de la duración del ciclo celular</i>	52
<b>Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>55</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>56</b>
<b>Apéndices</b>	<b>60</b>
<i>Tabla 3. Doble marcaje con análogos de la timidina: Metodología reportada</i>	60
<i>Tabla 4. Doble marcaje con análogos de la timidina: Metodología propuesta</i>	61
<i>Tabla 5. Valores promedio de la fracción saliente</i>	65
<i>Tabla 6. Método de marcaje acumulativo con BrdU</i>	65
<i>Tabla 7. Porcentaje de Mitosis Marcadas</i>	66

---

# Índice de figuras

---

1.	<i>La extremidad del embrión como modelo de estudio de la morfogénesis de la extremidad</i>	8
2.	<i>La morfogénesis de la extremidad</i>	9
3.	<i>Esquema de las fases del ciclo celular y su regulación</i>	13
4.	<i>Marcadores empleados para determinar la proporción de células que están proliferando en un tejido</i>	15
5.	<i>Modelos existentes que explican cómo ocurre la morfogénesis de la extremidad en estadios tempranos</i>	17
6.	<i>Los movimientos celulares orientados permiten la elongación del primordio</i>	19
7.	<i>Modelos existentes que explican cómo ocurre la separación de los dedos</i>	20
8.	<i>Estadios de diferenciación de las extremidades empleadas para la realización de los experimentos de este trabajo</i>	24
9.	<i>Determinación del número de células presentes en la región distal del dedo en desarrollo</i>	26
10.	<i>Diseño experimental del método de marcaje acumulativo con BrdU para la determinación de la duración del ciclo celular</i>	28
11.	<i>Metodologías propuesta y reportada para la determinación de la duración del ciclo celular, mediante la incorporación de dos análogos de la timidina</i>	29
12.	<i>Fracción de mitosis marcadas contra el tiempo después de la inyección de BrdU</i>	30
13.	<i>Obtención de la curva que limita la región distal del dedo</i>	33
14.	<i>Inmunolocalización del antígeno Ki-67</i>	34
15.	<i>Colocalización de la marca del antígeno Ki-67 con BrdU</i>	35
16.	<i>Hibridación in situ de N-myc</i>	35
17.	<i>Especificidad en el reconocimiento del IdU o CldU</i>	36
18.	<i>Incorporación de dos análogos de la timidina a extremidades en cultivo: metodología reportada</i>	38
19.	<i>Incorporación de dos análogos de la timidina a extremidades en cultivo: metodología propuesta</i>	39
20.	<i>Gráfico de la fracción saliente contra el tiempo</i>	40
21.	<i>Gráficas del valor de LI contra el tiempo</i>	41
22.	<i>Inmunodetección de la histona H3 fosforilada</i>	42
23.	<i>Diferentes tratamientos para exposición de BrdU y la histona H3 fosforilada</i>	43
24.	<i>Gráfico del porcentaje de mitosis marcadas contra el tiempo</i>	44
25.	<i>Determinación de la duración del ciclo celular en una extremidad de ratón en estadio S4</i>	46



---

# Introducción

---

El desarrollo embrionario constituye un proceso ordenado que permite el crecimiento del huevo fecundado hasta alcanzar la organización y complejidad del organismo maduro (8); todo esto bajo la cuidadosa dirección del genoma que la célula inicial va heredando a cada una de las células hijas que conformarán este organismo. La expresión selectiva de genes durante el desarrollo controla cuatro procesos fundamentales que modelan al embrión: la proliferación celular, la especialización, las interacciones celulares y la migración (1).

Previo al desarrollo de los órganos y estructuras que conforman al embrión es necesaria la aparición de una estructura inicial denominada “primordio”, compuesta por células precursoras, y regulado, tanto en aparición como en localización, por la expresión de diversos genes y los factores proteicos que codifican, tales como los miembros de la familia Hedgehog, WNT (combinación del Inglés *Wingless – Int*), TGF’s (del Inglés *Transforming Growth Factors*), BMP’s (del Inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), y miembros de la familia de los FGF’s (del Inglés *Fibroblast Growth Factors*) (8).

## *El embrión de ratón como modelo de estudio*

Una de las ventajas del estudio del desarrollo en embriones es el hecho de que organismos de diferentes especies comparten el conjunto básico de genes y proteínas conservadas que dirigen este proceso, y las vías de señalización que las regulan (1).

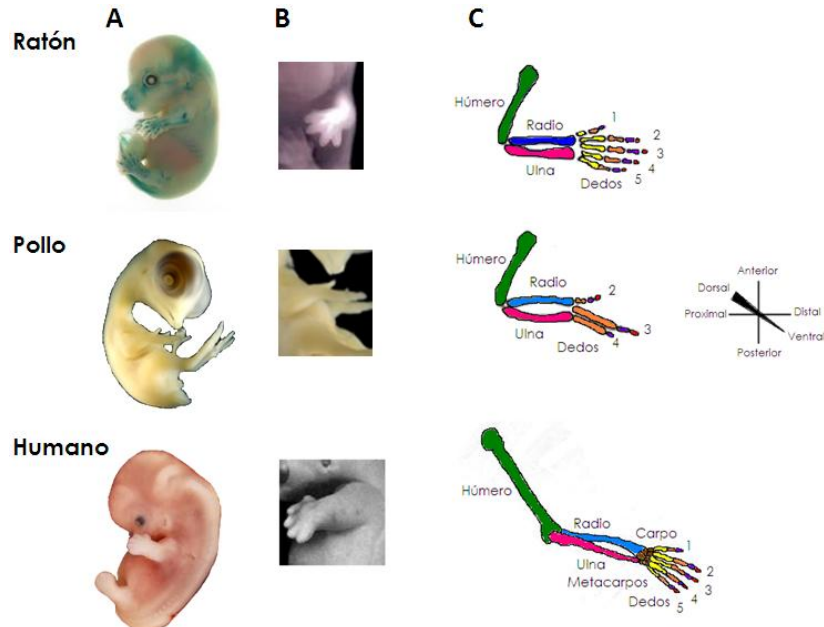
La extremidad en desarrollo del embrión, principalmente del embrión de ratón y de pollo, constituye un buen modelo para el estudio de la embriogénesis y los mecanismos celulares y moleculares que la regulan, debido a que en ella se manifiestan la mayoría de los procesos que dan origen y modelan la fisionomía del organismo, y determinan su funcionalidad (fig. 1) (66), tales como la proliferación, muerte celular o migración celular. Al no constituir elementos esenciales para la supervivencia de un organismo, las extremidades pueden manipularse experimental y molecularmente para su estudio, y los genes que regulan el desarrollo de la extremidad participan además en el desarrollo de muchos otros órganos y estructuras (fig. 2) (48).

El embrión de ratón constituye el modelo embrionario de mamífero más conveniente para montar estudios genéticos, debido a que es pequeño y fácil de reproducir. Además, su genoma es casi del mismo tamaño que el genoma humano, y existe una identidad muy alta entre genes humanos y de ratón. A la fecha, existen un gran número de estrategias para la manipulación molecular de este organismo (1).

## *Desarrollo de la extremidad*

La adquisición de forma de la extremidad puede estudiarse en 4 fases: establecimiento del campo de la extremidad (surgimiento del primordio), producción de señales que darán forma a la extremidad desde centros organizadores específicos, obtención de la información posicional por la expresión de genes particulares y, finalmente, diferenciación de las estructuras de la extremidad por la información posicional proporcionada (27). Los factores genéticos que

controlan la aparición del primordio, su crecimiento y diferenciación han sido ampliamente estudiados (8) (fig. 2), sin embargo, se desconoce cuáles de ellos regulan de manera específica fenómenos determinantes en la morfogénesis de la extremidad, y por qué mecanismos llevan a cabo sus efectos.



**Figura 1.** El modelo de la extremidad del embrión, principalmente de ratón y de pollo, permite estudiar los mecanismos celulares y moleculares que llevan a la morfogénesis de la extremidad de mamíferos. **A.** Embriones de embriones de ratón, pollo y humano. **B.** Fotografías de extremidades en desarrollo de cada uno de estos organismos. **C.** Esquemas de las extremidades adultas y los elementos que las constituyen.

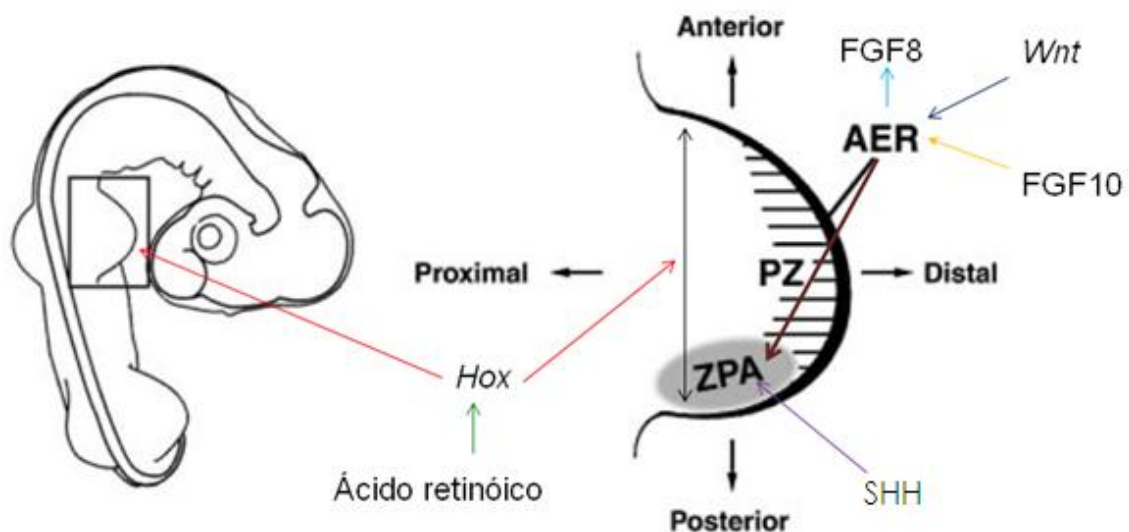
Los genes de la familia *Hox* (del Inglés *Homebox*), como *Hoxc4* y *Hoxc5* determinan el posicionamiento inicial del primordio, y le proporcionan identidad en el eje antero – posterior. Su expresión se regula por la presencia de ácido retinóico. Cuando se ha determinado la ubicación de la extremidad, el primordio crece por proliferación de células de la placa lateral del mesodermo, inducidas por factores producidos en el mesodermo intermedio, tales como el FGF8, que mantiene las células en estado proliferativo (8).

Con el crecimiento del primordio, células de la placa lateral del mesodermo secretan el factor FGF10, lo que lleva a la aparición de la cresta ectodérmica apical (AER, del Inglés *Apical Ectodermal Ridge*) (fig. 2), un centro organizador que separa las caras ventral y dorsal de la extremidad. Esta estructura secreta FGF8, manteniendo sus niveles elevados en el mesodermo subyacente, de modo que se continúe estimulando la proliferación de las células y la aparición de la zona de progreso (PZ, del Inglés *Progress Zone*) (fig. 2). La PZ está constituida por las células mesenquimatosas en proliferación de la parte distal de la extremidad, y conforme la extremidad crece, las células abandonan la PZ hacia zonas más proximales; ahí las células se condensan e inician su proceso de diferenciación, dando origen a los elementos cartilagineos que conformarán el esqueleto de la extremidad (8).

La AER también dirige la aparición de la zona de actividad polarizante (ZPA, del Inglés *Zone of Polarizing Activity*) (fig. 2), un centro regulador que establece el eje antero – posterior de la extremidad. Su función está mediada por Sonic hedgehog (SHH), conocido agente morfógeno y regulador del ciclo celular en células adultas. En la extremidad, es requerido para mantener el crecimiento y diferenciación de las estructuras intermedias y distales (8). SHH está distribuido

en la extremidad con un gradiente de posterior – anterior, que permite la especificación de las células del mesénquima (85). Se destaca su importancia en la adquisición de la identidad antero – posterior de los dedos (34), excepto en la del pulgar, que requiere la presencia de otros factores, como TBX5 (del Inglés, *T-box*) u otros miembros de la familia de *Hox* (33, 45).

La inducción de la AER está mediada por genes de la familia *Wnt* (fig. 2), y existe un mecanismo complejo que mantiene su actividad; esto puede ser: promoviendo la proliferación en la AER, inhibiendo la muerte celular programada, o ambos. Factores de la familia de los BMP's ejercen un efecto represivo sobre el mantenimiento de la AER, y participan en la diferenciación del cartílago. La morfogénesis de la extremidad en el eje dorso – ventral está regulada por la actividad de genes de la familia de *Wnt*, provenientes del ectodermo dorsal (8).



**Figura 2.** La morfogénesis de la extremidad, desde la aparición del primordio, está regulada por la expresión de diversos genes y por la presencia de factores de crecimiento que se secretan en función de diversos estímulos. **AER:** Cresta ectodérmica apical; **ZPA:** Zona de actividad polarizante; **PZ:** Zona de progreso. Modificada de 8.

Todos los mecanismos regulatorios anteriores permiten el desarrollo de la extremidad hasta alcanzar a formar la estructura presente en el organismo adulto, que consiste de una parte proximal con un solo elemento, el estilópodo; una parte medial con dos elementos, el zeugópodo; y una parte distal, el autópedo, compuesto por el carpo o el tarso, y los dedos. Estas estructuras se desarrollan en una secuencia próximo – distal a partir de las células que abandonan la PZ. Algunas células localizadas alrededor de estos elementos inician el proceso de muerte celular programada (PCD, del Inglés *Programmed Cell Death*), lo que contribuye a dar forma al autópedo. Durante la formación de los elementos esqueléticos ocurre reemplazo de cartílago por hueso, el crecimiento de los huesos por proliferación y diferenciación, y la formación *de novo* de huesos a partir de células precursoras mesenquimatosas (8).

### **Moléculas involucradas en el desarrollo de la extremidad**

El tamaño y la forma de un órgano o una estructura depende del número y tamaño de las células que lo conforman, y esto a su vez depende de los factores que estimulan la proliferación, la muerte y el crecimiento celular. Las vías de señalización que regulan estos procesos son generalmente activadas por proteínas extracelulares difusibles que se unen a la superficie celular, o componentes de la matriz extracelular, y pueden clasificarse en 3 tipos, dependiendo de su función (1):

- \* Mitógenos, que estimulan la división celular,
- \* Factores de crecimiento, que estimulan el crecimiento celular por un incremento en la masa, y
- \* Factores de supervivencia, que promueven la supervivencia celular bloqueando la apoptosis.

### *Mitógenos y factores de crecimiento*

La familia de los FGF's, es una familia de potentes mitógenos que están involucrados en la formación de muchos tejidos, con una expresión espacial y temporal altamente reguladas. Los FGF's tienen un papel muy importante durante el desarrollo y adquisición de forma de la extremidad (32). FGF8 está involucrado directamente en el surgimiento del primordio y su diferenciación próximo – distal, y se cree que es responsable de mantener elevados los niveles de proliferación que llevan a la proyección del mismo (27). Además de FGF8 otros miembros de la familia de los FGF's están involucrados en el surgimiento y mantenimiento de la AER, como FGF10, que induce su aparición inicial, y FGF4, FGF9 y FGF17 que se encuentran limitando su borde posterior distal (49).

Los efectos biológicos de los FGF's son el resultado de una cascada de transducción de señales que se inicia cuando sus receptores son activados desencadenando así cascadas de señalización que involucran la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MapK, del Inglés, *Mitogen Activated Protein Kinase*) y la fosfatidil – inositol – 3 cinasa (PI3K, del Inglés, *Phosphoinositide – 3 Kinase*), y que generalmente culminan en la estimulación o inhibición de la transcripción de genes blanco (32). Las señales mitogénicas de los FGF's pueden controlar la tasa de división celular actuando sobre moléculas regulatorias de la fase G1 del ciclo celular. El crecimiento celular referido al incremento en la masa de las células no debe confundirse con el aumento en el número de éstas estimulado por los factores mitogénicos. (1).

### *Factores de supervivencia*

Los factores de supervivencia impiden que las células inicien el proceso de apoptosis, generalmente uniéndose a receptores de la superficie celular que previenen la acción de factores proapoptóticos y/o favorecen la expresión y acción de factores antiapoptóticos. Se ha demostrado que FGF8 provee señales antiapoptóticas durante el desarrollo de la extremidad, estimulando el crecimiento a través de la activación de mecanismos de sobrevivencia.

### *Morfógenos*

Los morfógenos son moléculas de señalización capaces de difundir creando gradientes de concentración desde la fuente que las produce hasta las células sobre las que ejercen su acción, imponiendo patrones de diferenciación a campos completos sobre los que actúan. Dependiendo de la distancia a la que las células se encuentren de la fuente de producción se verán sometidas a diferentes concentraciones del morfógeno, y responderán de maneras distintas a su acción. Uno de los ejemplos más claros de este tipo de moléculas está representado por la proteína SHH, que como ya se mencionó, es producida en la PZA de la extremidad en desarrollo, y dirige la diferenciación en sentido antero – posterior (2) y el crecimiento de los dedos (23).

El ácido retinoico es otro conocido morfógeno involucrado en la regulación de la diferenciación de varias estructuras durante la embriogénesis; particularmente, está involucrado en la diferenciación antero – posterior de la extremidad. Se cree que es liberado

en la ZPA y crea un gradiente de actividad de posterior – anterior, que le da identidad a cada uno de los dedos (50).

#### *Moléculas inhibitorias*

El número y tamaño de las células también está controlado por señales inhibitorias que son producidas de manera externa (1). Por ejemplo, la familia de proteínas del TGF- $\beta$  inhibe la proliferación bloqueando la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S, o estimulando la apoptosis. Los BMP's son miembros de esta familia que llevan a cabo diversas funciones y se ha propuesto que ejercen un rol en controlar los sitios de acción del morfógeno SHH, regulando negativamente su transcripción (4). Se ha encontrado que BMP2, BMP4 y BMP7 proveen señales que permiten el inicio de la PCD tanto en el ectodermo de la AER como en el mesénquima de la extremidad del pollo. Se cree que durante la morfogénesis de los dedos, los mismos BMP's activan la PCD en el tejido del interdígito para permitir la separación de los dedos y evitar la sindactilia (65). No obstante, si bien esta propuesta está bien consolidada en el pollo, resultados de nuestro grupo indican que esto no ocurre en la extremidad del ratón donde los BMPs más bien parecen controlar el crecimiento/ proliferación a través de regular la expresión de FGF8.

#### *Otras moléculas*

Existen varios genes que codifican para factores transcripcionales que pueden estar involucrados en la regulación del crecimiento y proliferación celular durante el desarrollo, necesarios para el proceso de morfogénesis. Por ejemplo, los genes de la familia *Myc* son reguladores fundamentales de la proliferación celular y se les considera esenciales durante el desarrollo del ratón (39).

En los mamíferos se han identificado 4 genes pertenecientes a esta familia: *C-Myc*, *N-Myc*, *L-Myc* y *S-Myc*, que comparten características estructurales, al igual que las proteínas para las que codifican (11). A pesar de las características que tienen en común, se cree que tienen funciones fisiológicas separadas, y hay evidencia de que sus patrones de expresión son distintos, dependiendo del tipo celular y el estadio de desarrollo (14).

Las proteínas de la familia *Myc* son indispensables durante el desarrollo del ratón, lo que se hace evidente al estudiar embriones nulos en estas proteínas, que mueren entre el día 10.5 – 11.5 post - fecundación (24, 47). La muerte de los embriones puede estar ampliamente asociada al fallo de diversos órganos que no son capaces de mantener la proliferación necesaria para la morfogénesis, en ausencia de estos factores (55).

Con el fin de generar estrategias para el estudio de la función de los genes de la familia *Myc* durante el desarrollo, se generó una línea celular de rata, nula en *C-Myc*, *N-Myc* y *L-Myc* (41). El resultado de esta alteración, fue un incremento dramático en la duración del ciclo celular, a pesar de que el crecimiento de las células continuó. Esto puede deberse a la desregulación de factores que controlan la entrada y progresión del ciclo celular, como las ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas (cdk's) o inhibidores de las cdk's, en ausencia de las proteínas *myc* (35). Por otro lado, la expresión inducida del gen *Myc*, o su sobreexpresión, promueve el crecimiento celular e inhibe la diferenciación (11).

#### ***Muerte celular programada y su importancia en el desarrollo***

La PCD está presente en el desarrollo de tejidos tanto de vertebrados como de invertebrados, y el programa intracelular de muerte puede ser activado o inhibido por una

gran variedad de estímulos ambientales fisiológicos o patológicos (25). Generalmente, la PCD que ocurre durante el desarrollo es del tipo apoptótica, un proceso en que la célula se contrae y se condensa, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y el DNA se fragmenta (25).

Durante el desarrollo, la muerte celular cumple con diversas funciones, como son: dar forma o esculpir estructuras, controlar el número de células, eliminar células anormales, mal posicionadas, no funcionales o dañinas, o producir células diferenciadas sin organelos (25). La separación de los dedos durante la formación de la extremidad es un modelo bien estudiado del papel de la PCD en la adquisición de forma de una estructura durante el desarrollo.

La maquinaria celular encargada del proceso de apoptosis consiste en una familia de proteasas, llamadas caspasas, que cuentan con una cisteína en su sitio activo, y que rompen enlaces en residuos de ácido aspártico en sus proteínas blanco. Generalmente estas proteasas son sintetizadas como procaspasas y requieren la activación por otras caspasas desencadenando así reacciones en cascada que llevan a la célula a morir por apoptosis (1).

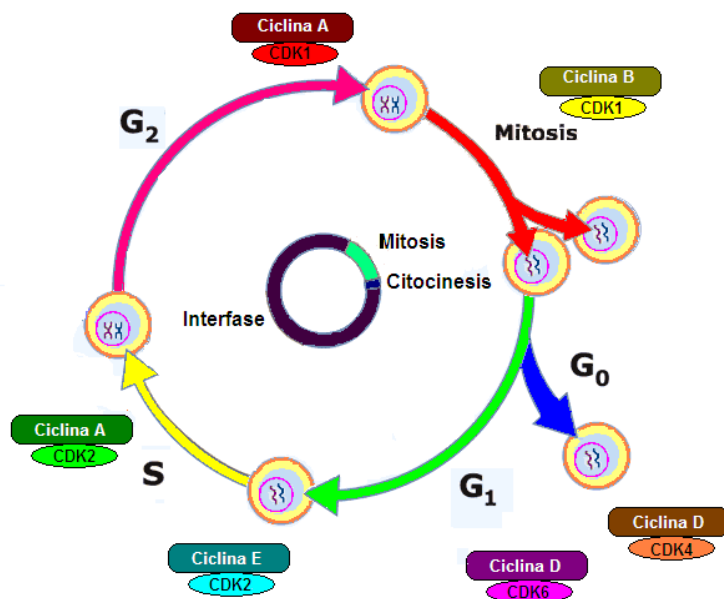
La activación de las caspasas iniciadoras ocurre principalmente por dos vías: la unión de señales extracelulares inductoras de muerte a receptores de la superficie celular, como el factor de necrosis tumoral (TNF, del Inglés, *Tumor Necrosis Factor*); o la activación por señales intracelulares inductoras de muerte, como el complejo del factor de apoptosis activador de proteasas 1 (Apaf-1, del Inglés, *Apoptosis protease – activating factor-1*) Apaf-1/citocromo c, proveniente de la mitocondria. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras son capaces de inducir la activación de caspasas efectoras, que rompen proteínas clave dentro de la célula, como las láminas nucleares o inhibidores de las DNAsas dentro del núcleo, de modo que favorecen la disrupción de la membrana nuclear y la fragmentación del DNA. Las cascadas de activación de las caspasas se auto – amplifican y son irreversibles (1).

### *El ciclo celular*

La proliferación implica una continua y controlada división celular, que involucra la replicación del material genético de la célula. El ciclo celular es una serie de pasos altamente regulados mediante los cuales una célula madre da origen a dos células hijas a las que hereda una copia idéntica de su material genético (fig. 3) (10).

En las células eucariotas el ciclo celular se divide en 4 etapas: la fase G1, en que la célula integra las señales de crecimiento e inhibitorias, y toma la decisión de seguir, pausar o salir del ciclo celular; la fase S, en la que ocurre la replicación del DNA; la fase G2, que prepara a la célula para el evento de división; y finalmente, la fase M o mitosis, en que los cromosomas replicados se segregan a las células hijas y ocurre la citocinesis o separación de las dos células hijas (26). Algunas células pausan su transición por el ciclo celular en un estado quiescente llamado fase G0. En conjunto, las fases G1, S y G2 constituyen la interfase del ciclo celular (75) (fig. 3).

En el embrión, la regulación de la progresión del ciclo celular se logra por la expresión de proteínas regulatorias del ciclo en momentos y tejidos específicos, así como con la integración de estímulos externos generados, por ejemplo, por el contacto célula – célula (3). Las ciclinas y las cdk's son ejemplos de estos reguladores, que además de controlar la progresión del ciclo celular de una fase a otra pueden estar involucradas en la regulación de la transcripción, reparación del DNA, diferenciación y apoptosis (26). La activación y desactivación de las ciclinas y las cdk's durante todo el ciclo celular, debido a su síntesis, degradación o inhibición por moléculas específicas, provee el principal mecanismo de control del ciclo (26).



**Figura 3.** Esquema de las fases del ciclo celular y su regulación por la asociación de las ciclinas y las cdk's. La expresión de estas proteínas regulatorias de manera específica permite el tránsito entre distintas fases del ciclo y evita que este prosiga en caso de daño al material genético.

Las cdk's son una familia de cinasas de serina/treonina que se activan en puntos específicos del ciclo celular, induciendo cascadas de señalización a través de la fosforilación de otras proteínas. Los niveles de cdk's se mantienen estables durante el ciclo celular, y son activadas periódicamente por las ciclinas presentes durante las transiciones de una y otra fase de ciclo. Las cdk's sólo son activas cuando están unidas a sus ciclinas (75).

Las ciclinas tipo D son las primeras en inducirse para estimular el paso de una célula en fase G<sub>0</sub> a fase G<sub>1</sub> (fig. 3) (26). Existen tres tipos de ciclinas D, y los tres se unen y activan a las cdk4 y cdk6 para formar un complejo que es capaz de fosforilar diversos sustratos, entre los que se encuentran la proteína retinoblastoma (RB). La fosforilación de esta proteína lleva a la ruptura de un complejo con la proteína desacetilasa de histonas, y libera los factores de transcripción E2F y DP-1, reguladores positivos de la transcripción de genes que permiten la transición de G<sub>1</sub> a S (75).

La fase G<sub>1</sub> tardía está regulada por la presencia de la ciclina E, que se asocia con cdk2 para permitir el paso a la fase S (fig. 3). El complejo de la ciclina E/cdk2 mantiene a la proteína Rb en estado hiperfosforilado, para activar la transcripción de genes necesarios para la entrada en la fase S (75). Del mismo modo, el complejo se asocia y fosforila a la proteína nuclear del locus ATM (NPAT, del Inglés, *Nuclear Protein Mapped to the ATM locus*), que también participa en la entrada del ciclo a la fase S (84). Finalmente, el complejo ciclina E/cdk2 fosforila a la histona H1, permitiendo la descondensación de cromosomas necesaria para la replicación del DNA (75).

En la fase S, la ciclina A se asocia a la cdk2, y esto regula el inicio de la replicación del DNA (fig. 3) a través de la fosforilación de la primasa de la DNA polimerasa  $\alpha$  (76), que está encargada de la síntesis del "primer" de RNA necesario para el inicio de la replicación (1). El inicio y transcurso de la mitosis se regula por el complejo de la ciclina B/cdk1 (75). Estos complejos pueden asociarse a proteínas como las láminas nucleares, histonas, o componentes del huso mitótico, para regular la asociación de los cromosomas al huso acromático y la separación de las cromátidas hermanas, entre otros procesos (26).

### *Puntos de regulación del ciclo celular*

El punto de restricción (R) es el punto del ciclo celular en la transición entre G1 y S en que la célula está comprometida a iniciar la síntesis del DNA y proseguir con el ciclo. Si existe daño al DNA antes de este punto, se induce un arresto del ciclo celular dependiente de p53, que estimula la transcripción de genes como *p21* o *Mdm2*. *p21* previene la replicación del DNA al asociarse con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, del Inglés, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), lo que impide la unión de esta última a la polimerasa  $\alpha$  durante la replicación, y disminuye su procesividad (1). *Mdm2* provee de un mecanismo de autoregulación sobre p53, uniéndose a esta proteína y facilitando su ubiquitinación, lo que la hace un blanco para la degradación en el proteosoma.

En respuesta al daño al DNA, p53 es capaz de inducir la expresión de la proteína Gadd45, que lleva a cabo efectos de reparación del material genético; cuando el daño al DNA es irreparable, p53 activa la transcripción de genes como *Bax*, de la familia de Bcl-2, que estimulan la liberación del citocromo C de la mitocondria, iniciando el proceso de apoptosis dependiente de la apertura del poro de la membrana mitocondrial (54).

Cuando el daño al DNA ocurre durante la fase G2, el ciclo celular se arresta en un proceso que puede ser dependiente o independiente de p53. En la respuesta independiente de p53, el DNA dañado activa señales que fosforilan e inactivan a Cdc25, impidiendo la defosforilación de cdk1, y por lo tanto, la entrada en mitosis (1). En la respuesta dependiente de p53, se incrementa la transcripción de *p21* y de la proteína 14-3-3  $\sigma$ , que se une a la ciclina B en el citoplasma impidiendo su entrada al núcleo (60).

### *Marcadores de proliferación celular*

Desde que ocurre la fertilización de un óvulo para la formación de un cigoto, las células comienzan a dividirse de manera activa para la generación de un nuevo organismo. Desde que se inició con el estudio de las divisiones celulares que llevan al desarrollo de un organismo, han surgido diferentes marcadores que permiten definir cuáles son las células que están proliferando en un tejido, en qué momento proliferan, e incluso cuál será su destino.

Entre los primeros marcadores que aparecieron con estos fines, se incluye el fósforo radiactivo, y las bases marcadas radiactivamente, como la timidina tritiada ( $H^3$ -timidina). Esta última puede añadirse a los medios de cultivo, o incluso inyectarse directamente a células o animales vivos, y se incorpora al DNA durante la replicación del material genético, sustituyendo a la timidina, de modo que permite el marcaje de las células que han atravesado por la fase S del ciclo celular. La presencia de la  $H^3$ -timidina se detecta comúnmente en una autoradiografía, identificándose como precipitados o gránulos de plata dentro del núcleo de las células.

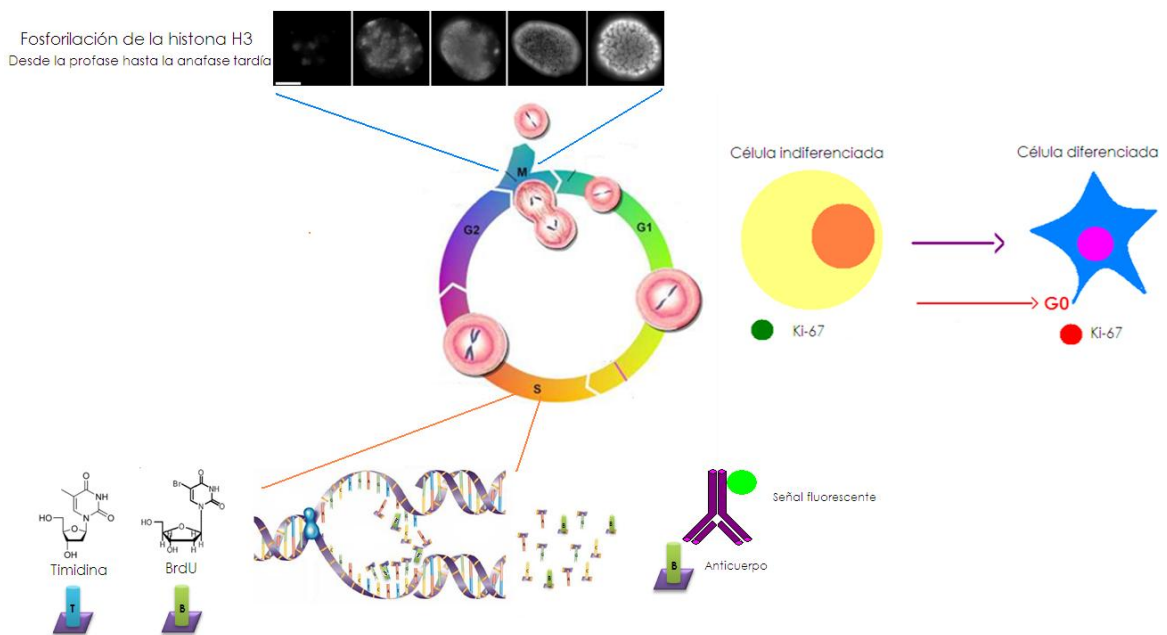
Como una alternativa al uso de la  $H^3$ -timidina surgieron los análogos halogenados de la timidina. Estos compuestos tienen una estructura muy similar a esta base nitrogenada, sólo que el grupo metilo de la posición 5 del anillo de pirimidina está sustituido por un halógeno, el más común, el bromo. La 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) se incorpora al DNA de la misma manera que la  $H^3$ -timidina, marcando a las células en la fase S del ciclo celular, pero a diferencia de este compuesto, puede identificarse empleando anticuerpos específicos que permiten su identificación mediante detecciones inmunohistoquímicas o inmunocitoquímicas (fig. 4) (74). Recientemente, han surgido además la 5-cloro-2-deoxiuridina (CldU), y la 5-iodo-2-deoxiuridina (IdU), que pueden ser identificados con anticuerpos que originalmente se



generaron para la identificación del BrdU, pero presentan una reacción cruzada que les permite identificar al CldU o al IdU de manera discriminativa (71, 74).

El fenómeno de proliferación celular también puede seguirse empleando marcadores que identifiquen la transcripción de ciertos genes. Es conocido que las modificaciones postraduccionales de las histonas pueden regular la expresión de genes, por ejemplo, la fosforilación de la histona H3 en el residuo de serina 10, ocurre específicamente durante la condensación de los cromosomas previa a la mitosis (fig. 4), y es esencial para su correcta segregación.

Otro marcador que permite el seguimiento de las células en proliferación es la proteína Ki-67, considerada como un marcador endógeno de proliferación. Se sabe que el Ki-67 se encuentra codificado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25), y su expresión puede correlacionarse con otros marcadores de proliferación como el BrdU (55). Esta proteína se encuentra en todas las fases activas del ciclo celular: G1, S, G2 y M, mientras que no está presente en células que se encuentran en estado quiescente (fase G0) (fig. 4) (16). Esta característica, y el hecho de que puede ser identificada con anticuerpos específicos, la hacen un buen candidato para la determinación de la fracción de proliferación de un tejido o un cultivo celular (16, 62).



**Figura 4.** Marcadores que pueden emplearse para determinar la proporción de células que están proliferando en un tejido y las distintas fases del ciclo celular en que se detecta su presencia. Los análogos de la timidina, como el BrdU, se incorpora al DNA durante la fase de replicación, y puede identificarse en un tejido mediante el uso de anticuerpos específicos. La entrada de una célula en mitosis puede monitorearse por la fosforilación de la histona H3, que correlaciona con la condensación de los cromosomas previa a la mitosis. El antígeno Ki-67 se considera un marcador endógeno de proliferación, está presente en todas las fases del ciclo celular y desaparece en células quiescentes.

---

# Antecedentes

---

## *Morfogénesis y desarrollo de la extremidad en su eje próximo-distal*

Se han propuesto diferentes modelos que tratan de explicar cómo ocurre la morfogénesis de la extremidad. Los modelos más recientes destacan las abundantes interacciones entre la actividad de morfógenos, mitógenos y factores transcripcionales regulatorios, que constituyen complejas redes de interacción, que se integran para permitir el crecimiento y la adquisición de forma de la extremidad en los diferentes ejes, de manera coordinada.

Actualmente, dos modelos principales dominan las teorías sobre cómo ocurre la morfogénesis temprana de la extremidad: el modelo de la zona de progreso, y el modelo de las dos señales (fig. 5).

### *Modelo de la zona de progreso*

Este modelo propone que las células más distales de la extremidad, conocidas como células de la zona de progreso (PZ), se mantienen en estado proliferativo, indiferenciado, gracias al estímulo de señales provenientes de la AER (64) (fig. 5). La identidad que las células adquieren depende del tiempo o etapa en la que las células salen de la PZ. En cuanto a los posibles candidatos para llevar a cabo esta señalización, proveniente de la AER, destacan los FGF's (49), principalmente FGF8, FGF4, FGF9, FGF10 y FGF17. En estadios tempranos del desarrollo FGF8 se encuentra presente en todo el borde distal de la extremidad, consistente con la presencia de la AER (85). En etapas más avanzadas del desarrollo, su presencia se restringe a la parte más distal de los dedos, donde mantiene a las células en estado proliferativo; la desaparición de FGF8 de la región del interdígito se asocia a la aparición de células apoptóticas (20).

Este modelo propone que la identidad de los elementos proximales de la extremidad queda determinada en estadios tempranos de desarrollo, porque salen antes de la PZ y dejan de recibir los estímulos de la AER para mantenerse indiferenciadas; las células que se mantienen por más tiempo bajo los estímulos de la AER, generan los elementos distales de la extremidad, y se especifican en etapas posteriores (83).

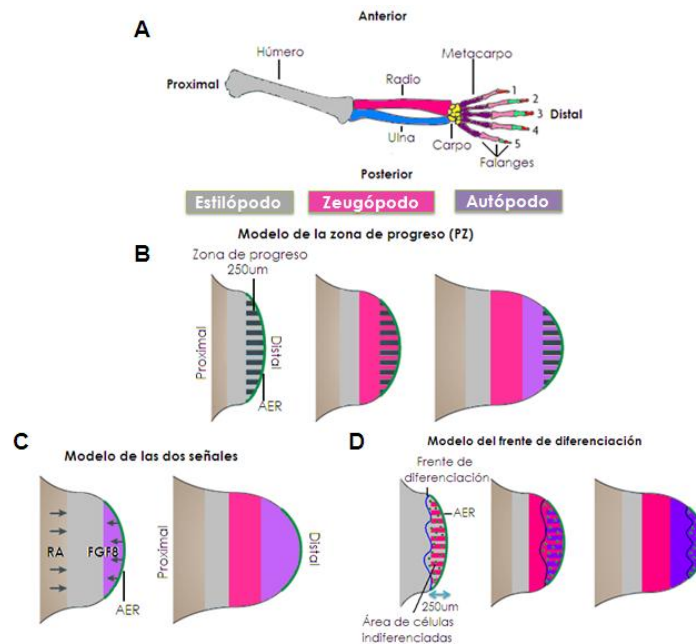
### *Modelo de las dos señales*

Este modelo propone la existencia de señales antagónicas, que especifican la identidad de las estructuras proximales y distales de la extremidad al regularse mutuamente (fig 5). El modelo propone que las actividades antagonistas del RA y los FGF's, en las regiones proximales y distales de la extremidad, especifican el eje próximo-distal de la extremidad en estadios tempranos (83).

Alternativamente, para explicar las bases moleculares y celulares poco sustentadas del modelo de las dos señales, surgió el *modelo del frente de diferenciación* (66). Este propone que durante la inducción del primordio, todas las células siguen el programa que les hará diferenciarse en elementos proximales; sin embargo, la aparición de la AER y las señales

provenientes de ella, actúan como señales antagónicas, evitando que se siga este programa en automático (fig. 5).

Ten Berge y col. (70), mostraron que miembros de la familia de *Wnt* participan con los FGF's provenientes de la AER, para mantener un borde distal de aproximadamente 250µm en un estado proliferativo, indiferenciado. Las células que se encuentran más alejadas de este borde proliferan menos y empiezan a expresar factores que inducen la diferenciación hacia elementos cartilagosos, como *Sox9* (70).



**Figura 5.** Modelos existentes que explican cómo ocurre la morfogénesis de la extremidad en estadios tempranos. **A.** Modelo de la zona de progreso; la identidad posicional y funcional que las células adquieren durante su diferenciación depende de la etapa en la que las células salen de la PZ. **B.** Modelo de las dos señales; la regulación antagónica del RA y los FGF's, en las regiones proximales y distales de la extremidad, respectivamente, especifican la identidad de los elementos en el eje próximo-distal de la extremidad en estadios tempranos. **C.** Modelo alternativo del frente de diferenciación; las señales provenientes de la AER mantienen una región distal, de aproximadamente 250µm, en un estado indiferenciado y proliferando, las células que van quedando en regiones proximales, salen de la influencia de esta señalización y empiezan a diferenciarse. Modificado de 83.

*Morfogénesis direccional y movimientos celulares orientados*

Recientemente, nuevas investigaciones han tratado de clarificar los mecanismos por los cuales el primordio aparece, se elonga y adquiere su forma característica, enfocándose en la importancia de los comportamientos celulares durante el desarrollo; esto ha sido posible gracias a la aparición de nuevas tecnologías que permiten el análisis de los comportamientos celulares de manera individual.

La regulación de los comportamientos celulares, tales como la polarización, la migración celular colectiva o la división celular orientada, es fundamental durante el desarrollo de diversas estructuras embrionarias, como el tubo neural (61). Wyngaarden y col., (80) han propuesto que la dirección de los movimientos celulares, la orientación de sus ejes longitudinales, y los cambios en los planos de la división celular, permiten el surgimiento del primordio a partir de la PLM (fig. 6).

Uno de los mecanismos más estudiados para la adquisición de polaridad de las células es la polaridad celular planar (PCP, del Inglés *Planar Cell Polarity*) (fig. 6), que se refiere a la adquisición de polaridad de una célula en el plano de una hoja, debido a la distribución asimétrica de los productos de los genes de polaridad, tales como *Frizzled*, *Dishevelled*, *Ltap/Vangl2*, o *Celsr1*, en vertebrados. (30, 45, 77). La PCP puede llevar a la elongación de un tejido por el mecanismo de convergencia y extensión (CE, del Inglés *Convergence and Extension*), proceso mediante el cual un tejido se reestructura para converger (confluir) a lo largo de un eje, y extenderse (elongarse) en un eje perpendicular, mediante movimientos celulares (77) (fig. 6).

Los modelos que proponen que la proliferación en las regiones distales del primordio es el principal proceso que permite la aparición y elongación de esta estructura no parecen satisfacer los requerimientos necesarios para la adquisición de su forma típica, y la extensión necesaria para el crecimiento rápido del tejido observado normalmente (6, 19).

Boehm y col., (6) generaron un modelo computacional tridimensional, para analizar los mecanismos mediante los cuales el primordio se elonga y adquiere su forma. Los autores determinaron que la proliferación de la región distal es insuficiente para generar la elongación del tejido, y es necesario que exista un mecanismo adicional que permita que este proceso se lleve a cabo.

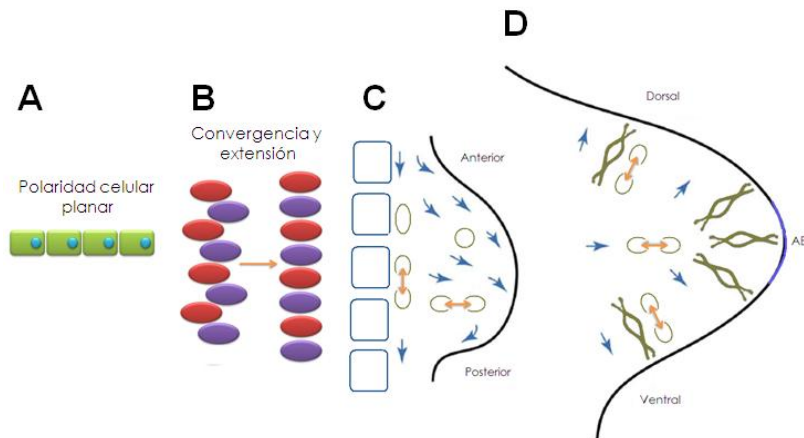
Analizando la incorporación de dos análogos de la timidina durante la replicación (IdU y BrdU), generaron un modelo tridimensional que muestra la distribución de la duración del ciclo celular en el mesénquima del primordio. Demostraron que la totalidad de las células del mesénquima se encuentra en proliferación activa, pero la duración de sus ciclos celulares varía, de aproximadamente 10h en la región más cercana a la AER, a casi 25h en las regiones próximas – centrales del primordio (6). Otras evidencias que sugieren que la totalidad de las células del primordio están proliferando, en estadios tempranos del desarrollo, vienen del análisis de la expresión de marcadores de proliferación, como PCNA o N-myc; éstos se encuentran distribuidos de manera ubicua y en la región distal – posterior del primordio, respectivamente, en la extremidad del pollo en estadio 24 (79).

El modelo de Boehm y col., demostró además, que el comportamiento isotrópico de las células, y la proliferación únicamente en la región distal, generaría una extremidad esférica, que requeriría que las células distales llevaran a cabo ciclos celulares de aproximadamente 1.5h, para alcanzar la elongación prevista para un primordio normal. De este modo, es necesario que las células presenten comportamientos orientados que permitan la elongación distal dirigida. En este contexto, la función principal de la proliferación en estos estadios del desarrollo, sería el de proveer una fuente continua y suficiente de células progenitoras que puedan orientarse para la proyección de la estructura (6).

Sería de gran trascendencia determinar si los mismos mecanismos actúan en la morfogénesis de la extremidad en estadios más avanzados del desarrollo, por ejemplo en la aparición, adquisición de forma y elongación de los dedos.

### ***Morfogénesis y separación de los dedos***

Actualmente, existen dos modelos principales que tratan de explicar cómo ocurre la separación de los dedos durante la morfogénesis de la extremidad: el modelo clásico y el modelo de la muerte progresiva (fig. 7).



**Figura 6.** Los movimientos celulares orientados permiten la elongación del primordio. **A.** Polaridad celular planar, se refiere a la adquisición de polaridad de una célula en el plano de una hoja. **B.** Mecanismo de convergencia y extensión, mediante el cual un tejido se reestructura para converger (confluir) a lo largo de un eje, y extenderse (elongarse) en un eje perpendicular, mediante movimientos celulares. **C.** Durante la aparición del primordio, las células provenientes de la placa lateral del mesodermo deben perder su orientación longitudinal, modificar la dirección de los movimientos celulares (de acuerdo a las flechas azules), y modificar la orientación del eje en el que ocurre la telofase (flechas naranjas). Modificado de 82. **D.** Alineación radial de los ejes longitudinales y las proyecciones de las células durante la elongación del primordio; los planos de la división celular y los movimientos celulares son mayoritariamente paralelos a esta orientación. Modificado de 6.

El modelo clásico, propone que todos los elementos del autópodo, incluido el tejido interdigital, proliferan y crecen hasta alcanzar su tamaño final; posteriormente, el tejido del interdígito degenera, y es eliminado. Las células del interdígito se eliminan por apoptosis, y el proceso es conocido como muerte celular interdigital (ICD, del *Inglés Interdigital Cell Death*). En este modelo, la función de la ICD es la de esculpir la extremidad, eliminando células de forma masiva (fig. 7) (21).

Se considera que la muerte celular programada tiene gran influencia en la adquisición de forma de la extremidad; se ha determinado que ocurre en los tres ejes principales y que es más abundante en la región ventral que en la dorsal y procede en un gradiente distoproximal (59). Suzuki y colaboradores demostraron que, en experimentos donde la maquinaria que induce la ICD ha sido bloqueada, se presenta sindactilia (65). Sin embargo, a pesar de que el tejido interdigital se conserva y no hay separación completa de los dedos, aún puede observarse crecimiento de los mismos.

Existen varias moléculas que podrían estar involucradas en la inducción de la ICD, sin embargo, los mecanismos por los cuales promueven o inducen la muerte celular no están bien identificados. Se cree que los BMP's podrían regular la ICD por su acción directa sobre el mesénquima, o de manera indirecta al actuar sobre la AER (20). Además, el RA es un conocido inductor de la PCD en diversos tejidos, durante la embriogénesis (2). Su participación durante la separación de los dedos se considera fundamental, ya que cuando las extremidades se tratan con cualquier antagonista de los receptores para el RA, la ICD disminuye (58).

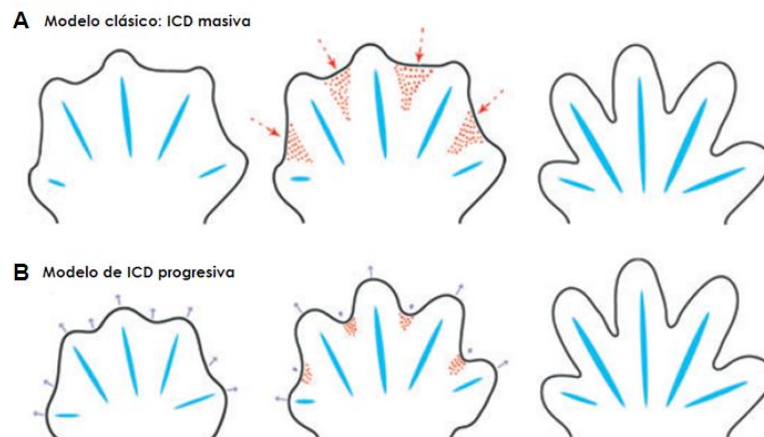
Por otro lado, se sabe que elementos de la familia de los FGF's ejercen una actividad de supervivencia sobre el mesénquima interdigital, previniendo que ocurra la ICD cuando se expresan ectópicamente (37). De esto puede deducirse que la separación adecuada de los dedos requiere una compleja interacción de señales que inducen la ICD y moléculas protectoras que favorecen la supervivencia del tejido.

Recientemente, en nuestro grupo ha surgido una nueva propuesta, en la cual se sugiere que la función de la ICD, más que la de esculpir la extremidad, es la de regular el crecimiento del tejido interdigital, de modo que la separación de los dedos ocurre por un crecimiento diferencial entre el mesénquima destinado a formar el dedo, y el mesénquima del interdígito (fig. 7) (21).

En etapas tempranas del desarrollo de la extremidad, la proliferación y el crecimiento en el borde distal ocurre de manera homogénea, y está estimulado por la señalización de FGF8 proveniente de la AER. Aproximadamente en el estadio de desarrollo E13 (siendo el E0 el día de la fecundación), correspondiente al estadio S8/S8+ según Wanek (78), aparecen áreas donde se activa la ICD en la región distal de los interdígitos. Esto correlaciona con la regresión de la AER, y por consiguiente, con la desaparición de FGF8.

La desaparición de FGF8 del ectodermo distal ocurre de manera gradual, desapareciendo primero del interdígito, y finalmente de los dedos, en donde queda un remanente en la punta, hasta estadios más avanzados. Este remanente permite que continúe expresándose FGF8 en este tejido, de modo que las células del mesénquima subyacente siguen proliferando en un estado indiferenciado. El crecimiento del tejido interdigital queda restringido por la muerte celular que se ha activado (21).

El modelo propuesto sugiere que la desaparición de FGF8 en el tejido interdigital, es la señal que activa la ICD; al no estar presente, desaparece su efecto protector, inductor de supervivencia, y las células quedan expuestas a las señales pro-apoptóticas (20). De este modo, el papel de la ICD sería mayormente crear un equilibrio con la proliferación para la adquisición final de la forma del dedo.



**Figura 7.** Modelos existentes que explican cómo ocurre la separación de los dedos. **A.** Modelo clásico; todos los elementos de la extremidad crecen de manera homogénea; la función de la ICD es la de esculpir la extremidad, eliminando de forma masiva el tejido del interdígito, para permitir la separación de los dedos. **B.** Modelo de ICD progresiva; en estadios tempranos todos los elementos de la extremidad crecen de manera homogénea; cuando la AER regresiona, el estímulo de supervivencia de FGF8 queda sólo presente en la punta de los dedos, permitiéndoles a las células del mesénquima subyacente seguir proliferando, y por lo tanto, permite el crecimiento del dedo. El crecimiento del tejido interdigital se ve restringido por la muerte celular. Modificado de 21.

### *División celular en la extremidad*

En distintos organismos pueden presentarse variaciones en los parámetros del ciclo celular, relacionadas con transiciones en el desarrollo. En general, la duración del ciclo celular

puede variar dependiendo de la especie o el estadio de desarrollo. Incluso, en el embrión, ciertas fases del ciclo celular pueden estar ausentes, por ejemplo, Hinegardner y colaboradores demostraron que en el embrión de erizo de mar la fase G1 no se detecta (22). Del mismo modo, Graham y colaboradores demostraron en *Xenopus laevis*, las primeras divisiones celulares ocurren muy rápidamente, y se alargan conforme el desarrollo procede, siendo las fases G1 y G2 apenas detectables (17). De manera menos común, la duración de la fase S en etapas tempranas del desarrollo también puede estar acortada; por ejemplo, en el tubo neural de embriones de ratón (29), o en la retina de embriones de pollo (15), puede durar hasta la mitad de lo que se considera su duración promedio en tejidos adultos; aún más asombroso, en las primeras divisiones de *X. laevis* ya mencionadas, su duración puede ser de hasta 10 minutos (17). En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de las variaciones en estos parámetros.

Tabla 1. Ejemplos de variaciones en los parámetros del ciclo celular		
Tejido	Duración del ciclo celular	Método de determinación
Zona subgranular del hipocampo del ratón adulto (38)	14h	Análisis de marcadores de proliferación como BrdU, histona H3 fosforilada, PCNA y Ki-67. Marcaje acumulativo de células con BrdU (CLM, del Inglés <i>Cumulative Labeling Method</i> ) y determinación del porcentaje de mitosis (PLM, del Inglés <i>Percent of Labeled Mitoses</i> )
Precursores neurogénicos de la zona ventricular de embriones de ratón (E10.5 – E14.5) (7)	13h	CLM
Corteza cerebral del embrión de ratón E14 (36)	Neurocortex: Tmax (duración máxima del ciclo) 14h, Tmín (duración mínima del ciclo) 12.3h; Arquicortex: Tmax 14.3h, Tmín 12.1h; Periarquicortex: Tmax 12.4h, Tmín 12.2h	CLM y PLM
Epitelio pseudoestratificado ventricular (PVE, del Inglés " <i>Pseudostratified Ventricular Epithelium</i> ") del cerebro de embrión de ratón (69)	E11 – 8.1h E 16 – 18.4h	CLM
PVE de embriones de ratón en E14 (68)	15.1h	CLM
Primeros estadios embrionarios de <i>Xenopus laevis</i> (46)	Primera división: 60 – 75 min. División 2 – 12: 30min.	Marcaje del DNA con [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (deoxi – citosin – trifosfato), monitoreo de las proteínas cdc2, Xe – wee1, cinasa de la histona H1 y la expresión del protooncogen <i>Mos</i> .

Diferentes estadios de desarrollo del endodermo de <i>Xenopus laevis</i> . (17)	Primeras divisiones (3.5 – 5h post-fertilización): 14 min.	Marcaje con timidina radiactiva y conteo de figuras mitóticas
Sistema nervioso central de gástrulas de pez zebra (31)	Ciclo #13: 54±9 min. #14: 78±8 min. #15: 151±59 min. #16: 240±71 min.	“Time – lapse microscopy” de embriones mutantes (golden <sup>b1</sup> pigment pattern mutation, que aclara los melanocitos y permite la visualización y seguimiento de los embriones hasta estadios avanzados).
Estadios embrionarios tempranos de pez zebra (28)	Ciclo #7: 14.2min., #8: 14.5min., #9: 15.0min., #10: 17.0min., #11: 22.5min., #12: 33.5min.	Seguimiento de la ruptura de la membrana nuclear y “Time Lapse Microscopy” de embriones marcados con tetrametilrodamina – isotiocianato
Progenitores eritroides de pollo adulto (13)	~ 20h	Determinación de la tasa de crecimiento exponencial de células en cultivo y citofluorometría.

Se considera que en promedio, el ciclo celular en mamíferos adultos tiene una duración de 16 – 24h, siendo la fase G1 la etapa más larga, con una duración de 6 – 12h; luego, la fase S, de 6 – 8h; la fase G2, de 3 – 4h; y finalmente la mitosis, que puede durar entre 30 minutos y 1 hora (1).

Se ha encontrado en el embrión de ratón, que en las divisiones celulares que ocurren dentro de las primeras 72 horas post – fecundación, la duración de las fases S, G1, G2 y la mitosis varían entre una y otra división. Se sabe además, que el proceso de gastrulación está antecedido por ciclos celulares rápidos, lo que se cree es necesario para la diversificación de los tipos celulares y la formación del embrión (3). Estudios en ratas y ratones mostraron la presencia de una zona de ciclos celulares inusualmente rápidos (2 – 3 horas) en una región llamada la zona proliferativa, localizada en la proximidad de la línea primitiva. Esta proliferación rápida no se mantiene en las células del mesodermo derivadas de esta zona, lo que sugiere que la transición entre células del ectodermo al mesodermo debe estar regulada dinámicamente (42).

Debe mencionarse, que como Graham y colaboradores suponen, tiempos tan cortos de la duración del ciclo celular son posibles en los estadios iniciales de desarrollo embrionario debido a que, a diferencia del desarrollo en estadios más avanzados, o en tejidos adultos, la división celular no implica un aumento significativo en la masa de la célula (17).

Trabajos anteriores en nuestro laboratorio mostraron que las células que se encuentran proliferando de manera activa en la extremidad son aquellas de la región más distal, lo cual es estimulado por la presencia de FGF8 (20) Del mismo modo, trabajos recientes demostraron que extremidades donde las células en proliferación fueron marcadas inicialmente con un pulso de 30 minutos con BrdU, e incubadas después por diferentes tiempos en medio de cultivo sin este análogo, el número de células y la intensidad de la marca del BrdU, identificada con un anticuerpo unido a un fluoróforo, disminuía, siendo identificada sólo en bajo porcentaje después de 12 horas de incubación. Esto sugirió que los ciclos celulares que



ocurren en la zona distal de los dedos de la extremidad, y que llevan al crecimiento y separación de los mismos, son de corta duración (menos de 12 horas).

---

## *Justificación*

---

Existen diversos modelos que tratan de explicar cómo ocurre la morfogénesis de la extremidad, y el papel que juega la ICD durante este proceso. El modelo propuesto por nuestro grupo, establece que el crecimiento diferencial de los dedos, más que la ICD masiva, es el mecanismo que permite la separación de los dedos durante la formación de la extremidad.

Se vuelve importante entonces, determinar si el crecimiento del dedo se ve favorecido por la presencia de divisiones celulares rápidas, que puedan jugar un papel preponderante durante el desarrollo.

---

## *Hipótesis*

---

Ciclos celulares de corta duración (< 12 horas), en la región distal, permiten el crecimiento acelerado del dedo de la extremidad en desarrollo.

---

## *Objetivos*

---

### **Generales**

Determinar la duración del ciclo celular en los dedos de la extremidad en desarrollo del embrión de ratón.

### **Específicos**

1. Estimar el número de células distales presentes en los dedos de la extremidad en desarrollo de embrión de ratón;
2. Determinar la duración del ciclo celular en los dedos en desarrollo del ratón;
3. Determinar la expresión de marcadores de proliferación en los dedos en desarrollo.

---

# Metodología

---

## *Animales*

Se emplearon ratonas de la cepa CD1, preñadas, y se sacrificaron a los 12.5 o 13.5 d.p.c. (días post-coito) para obtener los embriones. Las extremidades de los embriones se disectaron en fresco seleccionando aquellas que se encontraban en estadios S8, S8+ o S9 (78) (fig. 8), dependiendo del experimento, y se colocaron en PBS 1X. Se conservaron en hielo para su uso posterior.



**Figura 8.** Estadios de diferenciación, según Wanek (78), de las extremidades empleadas para la realización de los experimentos de este trabajo de tesis. **A.** S8, **B.** S8+, **C.** S9.

## *Cultivo de las extremidades*

Extremidades en estadios S8, S8+ o S9 disectadas en fresco, se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium, Invitrogen) simple, sobre un filtro de nitrocelulosa, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante el tiempo deseado. En el caso del cultivo en presencia de los análogos de la timidina, las extremidades en los estadios mencionados se cultivaron sumergidas en medio DMEM con BrdU (10µg/mL) (Invitrogen), CldU (10µg/mL) (Invitrogen) o IdU (10µg/mL) (Invitrogen), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante el tiempo deseado.

## *Procesamiento de las extremidades después del cultivo*

Después del cultivo, las extremidades se fijaron en p-formaldehído (PFA) al 4%, toda la noche a 4°C. Posteriormente, se embebieron en parafina a 65°C, también toda la noche, y se procesaron para obtener cortes de 7µm en un micrótopo. Los cortes obtenidos se desparafinaron en xilol a 65°C, se rehidrataron, empleando concentraciones decrecientes de etanol (100%, 75%, 50%, 0%; cada una durante 30 minutos), y se estabilizaron en PBS 1x durante 10 minutos. Las muestras se mantuvieron en PBS 1X a 4°C para su procesamiento posterior.

## *Detecciones inmunohistoquímicas*

Los cortes obtenidos en el micrótopo, desparafinados y rehidratados, se trataron por alguno de los siguientes métodos:

### *Hidrólisis del DNA con HCl*

Se trataron con HCl 2N durante 30 minutos a 37°C; se lavaron con PBS 1X, 3 veces por 5 minutos. El exceso de ácido se neutralizó con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1N pH 8.5, por 10 minutos a temperatura ambiente (TA), y se lavaron nuevamente 3 veces con PBS 1X.

*Exposición del antígeno con buffer de citratos pH 6.0*

Se trataron con un buffer de citrato de sodio pH 6.0, durante 1h a 65°C, y se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos.

*Exposición del antígeno por tratamiento en autoclave*

Se trataron con el mismo buffer de citrato de sodio pH 6.0, en una autoclave a 100°C y alta presión durante 10 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos.

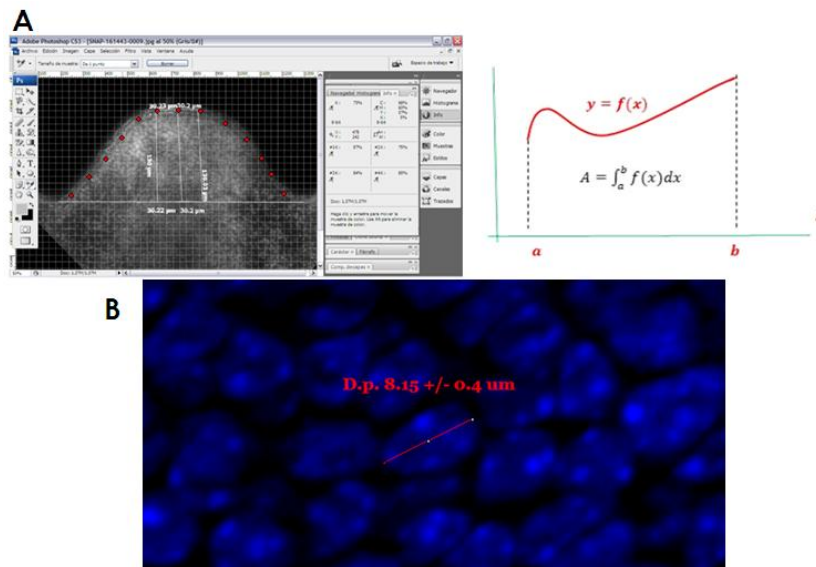
Después de la desnaturalización o hidrólisis, se bloquearon con una mezcla de suero fetal bovino al 10% y tritón X -100 al 0.2%, en PBS 1X, durante 30 minutos a TA. La inmunodetección se realizó empleando uno de los siguientes anticuerpos, o una combinación de ellos:

- a. Mouse anti BrdU (2272MBU, Accurate Chemical) clona IIB5, 1:200, incubado a 4°C por 18 – 24h, + Goat anti mouse IgG acoplado a Alexa 594 o Alexa 488, 1:1000, incubado por 1h a TA.
- b. Mouse anti BrdU (347580, BD Biosciences) clona B44, 1:150 o 1:300, incubado a 4°C por 18 – 24h, + Goat anti mouse acoplado a Alexa 594 1:1000, incubado a TA durante 1 hora.
- c. Rat anti Brdu (OBT0030, Accurate Chemical) clona BU1/75, 1:150 o 1:300, incubado a 4°C por 18 – 24h, + Donkey anti rat acoplado a Alexa 488, 1:1000, incubado durante 1.5h a TA.
- d. Rabbit anti histona H3 fosforilada (Cell signalling) 1:300, incubado a 4°C por 18 – 24h, + Goat anti rabbit acoplado a Alexa 488, 1:1000, incubado a TA durante 1 hora.
- e. Rabbit anti Ki-67 (BioBS) 1:50, incubado a 4°C por 18 – 24h, + Goat anti rabbit acoplado a Alexa 488, 1:1000, incubado a TA durante 1 hora.

El análisis de las muestras se realizó en un microscopio de epifluorescencia.

*Estimación del número de células en la región distal de los dedos en desarrollo*

Extremidades en estadios S9 disectadas en fresco se colocaron en PBS 1X a TA y se lavaron 3 veces, durante 5 minutos. Las extremidades se procesaron para obtener cortes en un micrótopo, como se mencionó anteriormente, y se tiñeron con 4',6- diamino-2-fenil indol (DAPI) (1µg/mL) en PBS 1X durante 5 minutos a TA. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia y se obtuvieron fotografías para su análisis posterior (fig. 9).



**Figura 9.** Determinación del número de células presentes en la región distal del dedo en desarrollo. **A.** Ejemplo de la determinación de las coordenadas del borde distal de una extremidad en estadio S9; graficando las coordenadas puede obtenerse la ecuación de la curva, y con ella y el valor del diámetro promedio de los núcleos, puede determinarse el área de la región distal del dedo. **B.** Corte en parafina de una extremidad en S9, teñida con DAPI (1µg/mL); se muestra un ejemplo típico de la medición de un núcleo, empleada para obtener el diámetro promedio. Mediciones realizadas empleando el programa “Axio visión”.

Empleando el programa “Adobe® Photoshop® CS3” (versión 10.0, Adobe systems incorporated © 1990 – 2007) fue posible determinar la ecuación de la curva que delimita a la región distal del dedo en desarrollo. El área esta región se determinó empleando la siguiente fórmula matemática:

$$A_T = \int_a^b f(x)dx \quad \text{(VIII)}$$

En donde  $A_T$  es el área total de la región distal, y  $f(x)$  es la ecuación de la curva antes mencionada.

Para determinar el número de células, se empleó el área de los núcleos ( $A_N$ ) en la región distal del dedo en desarrollo, establecido a partir del valor promedio del radio de las células ( $r$ ), y de la fórmula del cálculo del área de un círculo (fig. 9):

$$A_N = \pi r^2 \quad \text{(IX)}$$

El dato del número total de células en la región distal del dedo se empleó en experimentos posteriores para determinar el porcentaje de células que expresan distintos marcadores de proliferación, con respecto al número total de células.

### ***Curva de incorporación de IdU y CldU en diferentes concentraciones***

Extremidades en estadios S8+ o S9 disectadas en fresco se colocaron en medio DMEM que contenía IdU ó CldU a diferentes concentraciones (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, y 10µg/mL) y se permitió que las extremidades quedaran sumergidas en el medio; se incubaron durante 2h. Las extremidades se procesaron para obtener cortes de 7µm en un micrótomo. Adicionalmente, la inmunodetección de los análogos en los cortes obtenidos se realizó variando las condiciones necesarias para la hidrólisis del DNA y las concentraciones de los anticuerpos empleados.

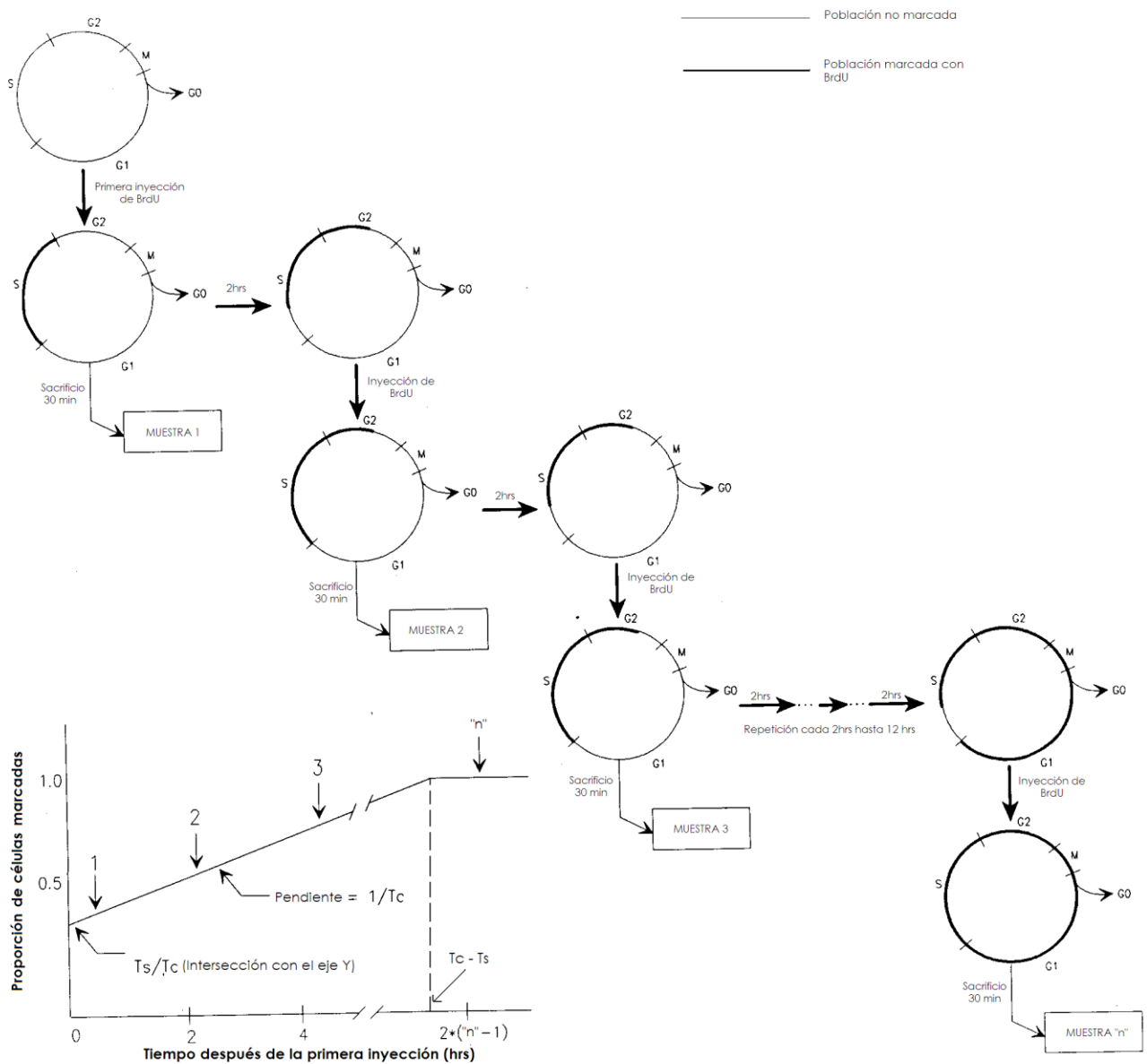
### ***Métodos de análisis de los parámetros del ciclo celular***

#### ***Método de marcaje acumulativo con BrdU***

Este método fue descrito inicialmente por Nowakowski y colaboradores en 1989 (51), y consiste en inyectar intraperitonealmente BrdU (50mg/kg de peso corporal) a ratonas embarazadas, en el estadio de interés, en intervalos de 2h, durante 12 horas continuas (fig. 10). 30 minutos después de la administración de cada una de las dosis de BrdU un animal se sacrifica y se extraen los embriones para realizar los análisis. Las células en la fase S se marcan de manera acumulativa por las exposiciones repetidas al BrdU, hasta que toda la población que está proliferando queda marcada. Contando el número de células marcadas puede determinarse la fracción de proliferación (LI = relación entre número de núcleos marcados y

número total de núcleos), que podría considerarse como un parámetro equivalente a la fracción de crecimiento del tejido ( $GF =$  relación entre la población en proliferación con respecto al total de la población). Con estos datos puede determinarse el tiempo total del ciclo celular ( $T_c$ ) y la duración de la fase S ( $T_s$ ) (fig. 10) (51).

Este método supone que la población de células que está proliferando está distribuida de manera asincrónica en cada una de las fases del ciclo celular, que su tasa de crecimiento se encuentra en equilibrio (el flujo de células que entran y salen de cada una de las fases del ciclo celular es constante), y que todas las células consideradas en el experimento están proliferando. De este modo, puede asumirse que el número de células en cada fase del ciclo es proporcional a la longitud de esa fase con respecto a la longitud total (51). En la figura 10 se muestra el diseño experimental del método, y las ecuaciones resultantes del gráfico del marcaje acumulativo de las células, cuya ecuación puede obtenerse por regresión lineal, y de donde pueden calcularse los valores de  $T_s$  y  $T_c$ . Además, puede obtenerse el índice de marcaje ( $LI$ ) a diferentes tiempos, que es la proporción de células marcadas con respecto al total de la población a un tiempo determinado.



**Figura 10.** Diseño experimental del método de marcaje acumulativo con BrdU para la determinación de la duración del ciclo celular. Cada inyección de BrdU marca únicamente la población de células que están proliferando en el momento de la administración. Determinando la proporción de células marcadas después de cada una de las inyecciones con el análogo, y obteniendo la ecuación de la recta resultante, pueden calcularse la duración de la fase S (Ts) y la duración total del ciclo celular (Tc). Modificado de 51.

De acuerdo a Li y colaboradores, el CLM provee un estimado del valor máximo de Tc, ya que corresponde al tiempo que requiere toda la población en proliferación para entrar en la fase S, incluidas las células que se dividen más lentamente, o que fueron las últimas en iniciar el ciclo celular (36).

#### *Administración de dos análogos de la timidina*

Si se emplea más de un análogo de la timidina administrado a diferentes tiempos, puede determinarse si una célula reingresa en el ciclo celular (71, 74). Para que esto sea válido, es necesario que:

- \* La presencia de un análogo pueda discriminarse por la reacción con un anticuerpo específico, sin que éste presente reacciones cruzadas con el anticuerpo que reconoce al otro análogo;
- \* Ambos análogos deben tener una permeabilidad equivalente en las células, es decir, que puedan ser incorporados en el DNA en la misma proporción cuando estén presentes durante la replicación;
- \* Los procedimientos de detección de ambos análogos deben ser compatibles; y
- \* La visualización de un análogo debe permitir visualizar la colocalización del otro análogo.

Los análogos empleados para la colocalización de células que han atravesado por más de un ciclo celular son el CldU y el IdU, o una combinación entre el BrdU y alguno de estos dos análogos. Su presencia se detecta empleando anticuerpos contra BrdU que presentan reacciones cruzadas específicas con cada uno de los análogos, de manera individual y no con el otro análogo.

Martynoga y colaboradores proponen un método para la determinación de la duración del ciclo celular (40), mediante el doble marcaje de células en fase S con BrdU e IdU. En esta estrategia, se administra una dosis de IdU intraperitoneal (50mg/kg) a una ratona embarazada, y 1.5h después, se administra la misma dosis de BrdU (fig. 11). La incorporación diferencial de uno u otro análogo por células que atraviesan de manera asincrónica por la fase S permite identificar 2 poblaciones distintas, y el tamaño relativo de estas poblaciones permite calcular la duración de la fase S (Ts) y la duración total del ciclo celular (Tc). Al mismo tiempo, se realiza un marcaje acumulativo de BrdU durante 8 horas, para identificar el porcentaje de células que están proliferando (40).

De este modo, si se considera que la relación de la duración de cualquier periodo del ciclo con respecto a otro periodo es igual a la relación entre el número de células presentes en cada uno de estos periodos, se tiene:

$$Lc = IdU^+ / BrdU^+ \quad (I) \quad \text{y} \quad Sc = IdU^+ / BrdU^+ \quad (II)$$

$$Ti / Ts = Lc / Sc \quad (III) \quad \rightarrow \quad Ts = Ti / (Lc / Sc) \quad (IV)$$

$$Ts / Tc = Sc / Pc \quad (V) \quad \rightarrow \quad Tc = Ts / (Sc / Pc) \quad (VI)$$

donde:

Lc: Fracción de células que abandonan la fase S en el tiempo  $T_i$

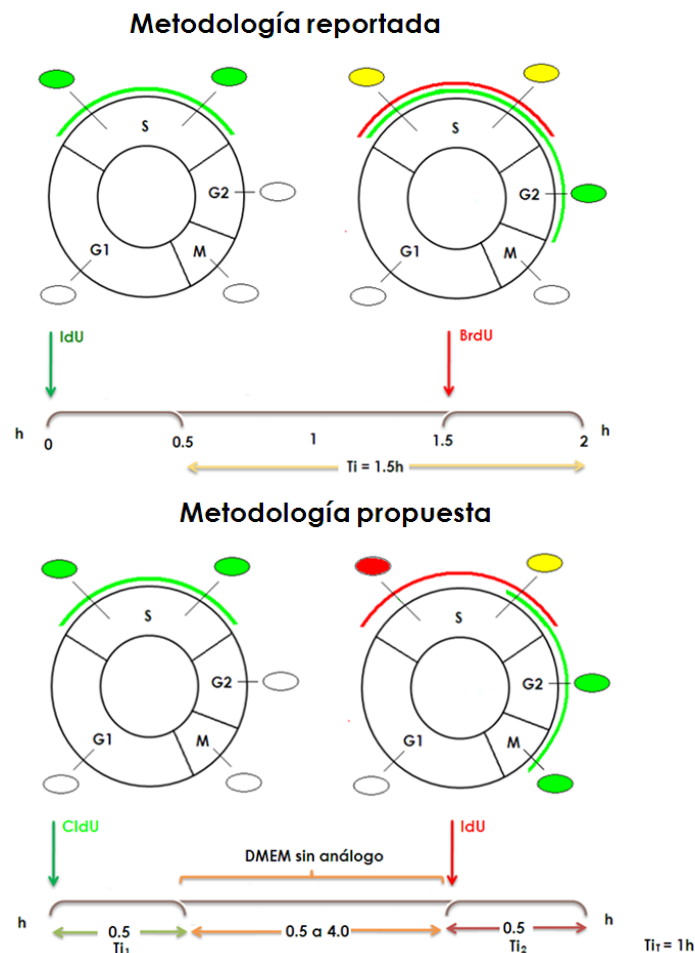
Sc: Número total de células al final del experimento

$T_i$ : Intervalo en que las células incorporan IdU, pero no BrdU

$T_s$ : Duración de la fase S

$T_c$ : Duración total del ciclo celular

Pc: Número total de células que están proliferando



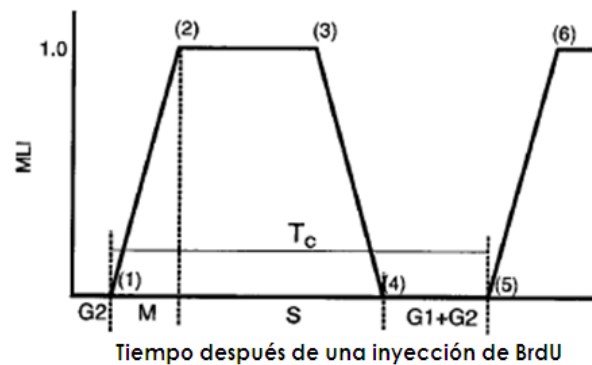
**Figura 11.** Esquema que muestra la estrategia experimental de la administración de dos análogos de la timidina (IdU y BrdU) para el marcaje de células durante una misma fase de replicación. **Metodología reportada:** Se administra primero IdU (50mg/Kg), que marca una población de células que se encuentran o entran en fase S durante 1.5h; después de este tiempo se administra BrdU (50mg/Kg) y se permite el marcaje durante 30 minutos, de modo que sólo las células que se encuentran en fase S durante ese tiempo incorporen este análogo.  $T_i$ , Tiempo de incorporación.  $T_{i1}$ , Tiempo de incorporación del primer análogo.  $T_{i2}$ , Tiempo de incorporación del segundo análogo.  $T_{iT}$ , Tiempo de incorporación total. Modificada de 40. **Metodología propuesta:** Se incuban las extremidades en medio con CldU (10 $\mu$ g/mL), que marca la población de células en fase S durante los primeros 30 minutos; se elimina el primer análogo del medio y se incuban las extremidades en medio DMEM sin análogo, durante tiempos variables (0.5 – 4h) y se administra el segundo análogo (IdU 10 $\mu$ g/mL) y se permite su incorporación 30 minutos, después de lo cual las extremidades se fijan y se procesan para su estudio.

Un cálculo similar puede aplicarse si los dos análogos empleados son el CldU y el IdU, en lugar de la combinación anterior. Esto podría dar la ventaja de una mayor especificidad en la identificación de cada uno de los análogos con anticuerpos que no tengan reacción cruzada

con el otro análogo (74). De acuerdo a esto, en una variante de la metodología establecida por Martynoga y col. (40), en este trabajo planteamos la siguiente estrategia: cultivar extremidades en estadio S8+/S9 en presencia de CldU o IdU (10µg/mL) durante 30 minutos, y después de este tiempo, pasar las extremidades a un cultivo sobre un filtro en medio DMEM sin análogo, durante diferentes tiempos (0.5 a 4h, tomando muestras cada 0.5h). Lo siguiente fue cultivar las extremidades en medio DMEM con el segundo análogo IdU o CldU (10µg/mL), según el caso, durante 30 minutos (fig. 11). Después de este tiempo las extremidades se procesaron para obtener cortes de 7µm en un micrótopo.

*Porcentaje de mitosis marcadas*

Uno de los primeros métodos empleados para este fin fue propuesto por Quastler y Sherman (56), y modificada por Takahashi para generar el método de determinación del porcentaje de figuras mitóticas marcadas (PLM) (67). En este método, se realiza también el marcaje de las células en la fase S, con análogos de la timidina o H<sup>3</sup>-timidina, y se determina el porcentaje de células que se encuentran en las diferentes etapas de la mitosis, por observación directa de las figuras mitóticas que además están marcadas con análogos de la timidina o H<sup>3</sup>-timidina. A partir de esta observación puede determinarse la relación de figuras mitóticas marcadas, con respecto al número total de figuras mitóticas (relación MLI). Si se determina este dato para diferentes tiempos, después de la inyección de BrdU, y se grafican los resultados (fig. 12), pueden analizarse los parámetros del ciclo celular:



**Figura 12.** Gráfica de la fracción de mitosis marcadas contra el tiempo después de la inyección de BrdU. Se indican los intervalos que marcan la duración de cada una de las fases del ciclo celular. (1) Aparición de la primera figura mitótica marcada; (2) MLI = 100%; (3) aparición de las primeras mitosis sin marcar; (4) última mitosis marcada deja M, MLI = 0%; (5) reaparición de la primera mitosis marcada; (6) MLI = 100% por segunda vez. Modificada de 67.

$T_{G2}$  = Tiempo entre la administración del análogo de la timidina y la aparición de la primera figura mitótica marcada

$T_{G2+M}$  = Tiempo requerido para que la población marcada entre a la fase M, y para que MLI = 100%

$T_S - T_M$  = Tiempo en que MLI permanece igual al 100% y luego disminuye hasta 0%

$T_c$  = Intervalo entre dos puntos correspondientes de ciclos celulares secuenciales, por ejemplo, entre dos puntos del 50% de MLI.

$$T_{G1} = T_c - (T_s + T_{G2} + T_M) \quad \text{(VII)}$$



Según Li y colaboradores (36), a diferencia del CLM, el PLM nos da un estimado del valor mínimo de la duración del ciclo celular, ya que determina el tiempo que las células con ciclo celular más rápido (las más adelantadas) requieren para pasar de una mitosis a otra.

### *Hibridación in situ de N-myc*

La sonda utilizada se sintetizó empleando el DIG RNA Labelling Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Extremidades en estadios S8 y S8+/S9 fueron disectadas en fresco y colocadas en PBS 1X; se fijaron durante toda la noche en PFA al 4%, a 4°C; se deshidrataron en metanol disuelto en PBT (PBS 1X + Tween 20 al 0.1%), en concentraciones crecientes (25%, 50%, 75%, 100%), durante 5 minutos, y se almacenaron en metanol absoluto a -20°C hasta su uso.

Previo a la hibridación, las extremidades se rehidrataron en metanol en PBT 1X, en concentraciones decrecientes (100%, 75%, 50%, 25%), durante 5 minutos. Se inactivó la peroxidasa en el tejido, incubando durante 1h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%, en PBT 1X, a TA. El exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se eliminó lavando 3 veces con PBT 1X, durante 5 minutos. El tejido se permeabilizó con proteinasa K (10µg/mL) en PBT 1X, durante 5 minutos. El exceso de proteinasa K se eliminó con una solución de glicina 2mg/mL en PBT 1X, por 5 minutos, y 2 lavados de 5 minutos cada uno, con PBT 1X. Las extremidades se trataron durante 20 minutos con una mezcla de glutaraldehído al 0.2% en PFA al 4% en PBT 1X, seguido de dos lavados de 5 minutos, con PBT 1X.

Después de estos lavados, las muestras se incubaron durante 1h a 70°C, con la mezcla de pre-hibridación (formamida 50%, SSC 5X pH 5, tRNA 50µg/mL, SDS al 1%, heparina 50µg/mL), que posteriormente fue reemplazada por nueva solución de pre-hibridación + 10µL de la sonda sintetizada; se mantuvo en incubación a 70°C durante toda la noche. Para eliminar la sonda que no se hibridó, las muestras se lavaron de la siguiente manera:

- \* Dos veces, solución de lavado 1 (formamida 50%, SSC 5X pH 4.5, SDS al 1%), durante 30 minutos, a 70°C.
- \* Una vez, 1:1 solución de lavado 1, más solución de lavado 2 ( NaCl 0.5M, Tris – HCl pH 7.5 10mM, Tween 20 al 0.1%), durante 10 minutos a 70°C.
- \* Cuatro veces, solución 2, durante 5 minutos, a TA.
- \* Una vez, solución 3 (formamida 50%, SSC 2X ph 4.5), durante 5 minutos a TA.
- \* Dos veces, solución 3, durante 30 minutos, a 65°C.
- \* Tres veces, TBST (NaCl 150mM, KCl 3mM, Tris – HCl 50mM, levamisol 2mM, Tween 20 al 0.1%), durante 5 minutos.

Las muestras se bloquearon con una mezcla de TBST, más suero de cabra inactivado al 10%, durante 2 – 3 horas, a TA. Después de este tiempo, se removió la solución de bloqueo y se añadió una mezcla de suero de cabra al 1% en TBST, más anticuerpo anti digoxigenina 1:2000 (Vector Laboratories), y se incubó a 4°C toda la noche. El anticuerpo no unido se lavó empleando TBST, 3 veces, durante 5 minutos, después, 4 veces durante 1h, y toda la noche a TA. Previo al revelado de la señal, las muestras se trataron con el buffer de fosfatasa alcalina NTMT (NaCl 100mM, Tris – HCl pH 9.5 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Tween 20 al 0.1%, levamisol 2mM) 3 veces, durante 10 minutos, y después se revelaron con una mezcla de nitro – azul de tetrazolio (NBT) (0.35mg/mL) y 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato (BCIP) (0.35mg/mL) en NTMT, durante 6 – 12h a TA, en la oscuridad. Las muestras se conservaron en glicerol al 80% en PBT, para su análisis.



**Figura 13.** Ejemplificación de la obtención de la curva que limita la región distal del dedo. **A.** Imagen procesada en “Adobe Photoshop CS3”. **B.** Corte de una extremidad embebida en parafina, teñida con Hoeschst; la determinación de la longitud del diámetro del núcleo se realizó empleando el programa AxioVision LE (Carl Zeiss Microimaging GmbH); **C.** Gráfica del procesamiento de datos en “Microsoft Excel 2007”.

Empleando el valor promedio del área de los núcleos, determinado previamente, pudo obtenerse un estimado del número de células presentes en los 100 $\mu$ m distales del dedo. Se obtuvo este mismo dato para 12 dedos diferentes, en estadios S8<sup>+</sup>/S9, y se usó el promedio para los cálculos posteriores. El valor promedio estimado fue:

$$\# \text{ células en los } 100\mu\text{m distales del dedo en desarrollo} = 821 \pm 56 \text{ células}$$

A continuación, un ejemplo de la obtención del dato antes mencionado:

$$\begin{aligned} A_{\text{Contorno}} &= \int_a^b f(x) dx \\ A_{\text{Contorno}} &= \int_3^{339} (-0.0062x^2 + 2.2109x + 11.022) dx \\ A_{\text{Contorno}} &= 50219.3 \mu\text{m}^2 \\ \# \text{ células}_{\text{Contorno}} &= 963 \text{ células} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} A_{100\mu\text{m}} &= \int_a^b f(x) dx \\ A_{100\mu\text{m}} &= \int_{107}^{244} (-0.0162x^2 + 5.8557x - 436.63) dx \\ A_{100\mu\text{m}} &= 9143.8 \mu\text{m}^2 \\ \# \text{ células}_{100\mu\text{m}} &= 175 \text{ células} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} A_{100\mu\text{m distales}} &= A_{\text{Contorno}} - A_{100\mu\text{m}} = 50219.3\mu\text{m}^2 - 9143.8\mu\text{m}^2 \\ A_{100\mu\text{m distales}} &= 41075.5 \mu\text{m}^2 \\ \# \text{ células}_{100\mu\text{m distales}} &= 788 \text{ células} \end{aligned}$$

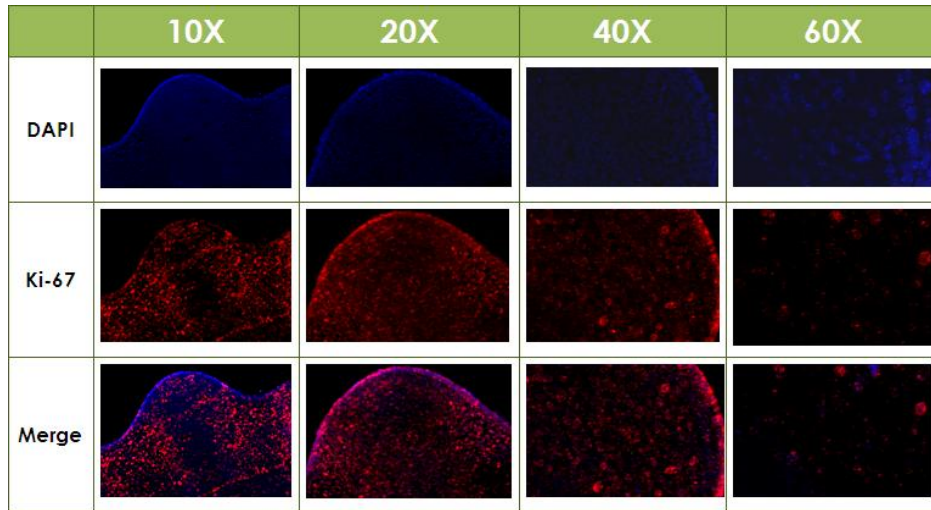
Es importante resaltar que la determinación de este valor se realizó considerando que la densidad celular en los 100 $\mu$ m distales del dedo del embrión no varía durante las etapas de desarrollo estudiadas.

## Determinación de la población que se encuentra en proliferación activa en la extremidad en desarrollo

---

Con el fin de determinar cuál es la proporción, del total de la población celular, que se encuentra proliferando activamente en la extremidad en desarrollo, se analizó la distribución en el tejido del antígeno Ki-67. Como se mencionó anteriormente, el antígeno Ki-67 se encuentra presente en todas las fases del ciclo celular, en células en donde la proliferación está activa, mientras que no está presente en células quiescentes (16). Los resultados pueden observarse en la figura 14.

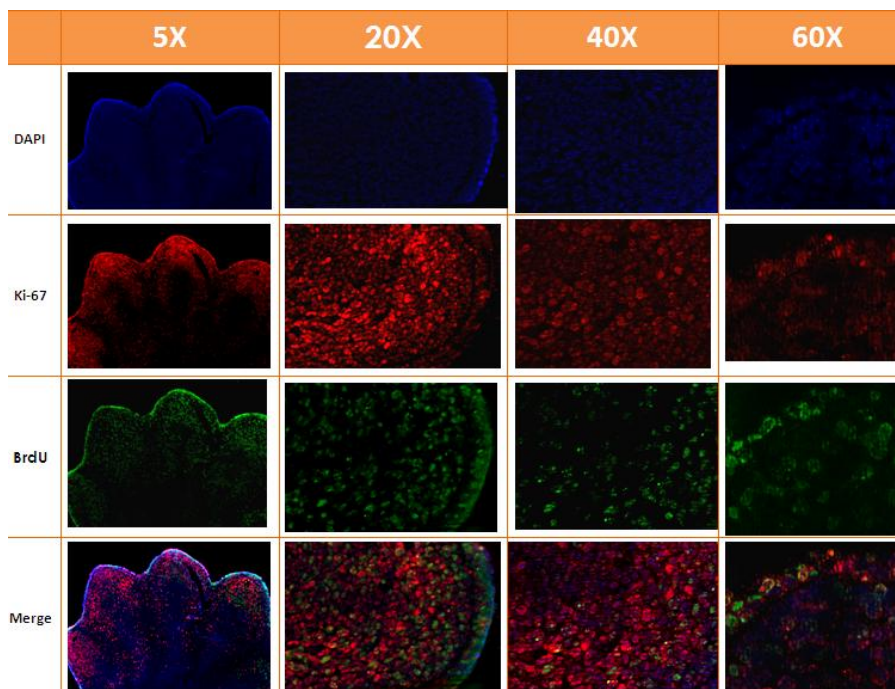
Como puede apreciarse, las células que presentan la marca del antígeno Ki-67, y por lo tanto, que se asume tienen un ciclo celular activo, no se restringen a la región distal del dedo, sino que se encuentran distribuidas a lo largo y ancho del dígito, con excepción de la región correspondiente a las estructuras cartilaginosas.



**Figura 14.** El antígeno Ki-67 está presente en todas las células del dedo en desarrollo, excepto en el área de las precondensaciones cartilaginosas. Inmunolocalización del antígeno Ki-67 en extremidades que fueron tratadas con el protocolo de exposición del antígeno con calor y alta presión.

Se realizó además la colocalización del antígeno Ki-67 con BrdU, en extremidades en estadio S8+/S9. Ya que este antígeno se encuentra en todas las fases del ciclo celular, y en todas las células que se dividen de manera activa, se espera que todas las células que incorporan BrdU (BrdU<sup>+</sup>), y que por lo tanto, han atravesado por la fase S del ciclo celular, presenten también la marca del Ki-67 (Ki-67<sup>+</sup>). Sin embargo, no todas las células que son Ki-67<sup>+</sup>, serán necesariamente BrdU<sup>+</sup>, ya que el BrdU se incorpora únicamente en las células en fase S, que constituye una fracción pequeña de la duración total del ciclo celular, mientras que el Ki-67 está en todas las fases de éste.

Como se muestra en la figura 15, todas las células que pasaron por la fase S tienen la doble marca esperada (Ki-67<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>), sin embargo, algunas presentan marcas más intensas ya sea con el BrdU o con el Ki-67, lo que puede deberse a que las células contienen uno u otro antígeno en mayor concentración. Se ha demostrado que la marca del Ki-67 puede disminuir durante la fase S del ciclo celular, o la mitosis, de modo que cuando la incorporación de BrdU es mayor, la señal del antígeno Ki-67 puede aparecer menos intensa (62).



**Figura 15.** El antígeno Ki-67 colocaliza con el BrdU en las células que han atravesado por una fase S del ciclo celular. Inmunolocalización del antígeno Ki-67 y del BrdU en extremidades que fueron tratadas con el protocolo de exposición del antígeno con calor y alta presión. El Ki-67 está presente en todas las células de la región distal del dedo en desarrollo, lo que indicaría que están en proliferación activa. Las células que incorporan la marca del BrdU (2h de exposición) también tienen la marca del Ki-67; la variación en la intensidad de la señal puede deberse a diferencias en la expresión del antígeno Ki-67 a lo largo del ciclo celular (59).

Los resultados de la localización del antígeno Ki-67 en la extremidad coinciden con los datos reportados que indican que las células de los 100µm distales del dedo en desarrollo proliferan de manera activa. En un experimento adicional, se realizó el conteo del número de células que presentan la marca del antígeno en la región distal de una extremidad en estadio S8+, obteniéndose como resultado que hay 907 células con esta marca, es decir, la totalidad de las células presentes en los 100µm distales. Este valor es similar al valor determinado del número de células presentes en la región distal, mostrado anteriormente.

### **Reguladores de la proliferación**

Con el fin de determinar si N-myc podría ser un candidato para regular la proliferación celular inducida por FGF8 durante la formación y separación de los dedos, en este trabajo se decidió analizar la localización de este gen, mediante hibridación *in situ*.

En la figura 16 pueden observarse los resultados, que muestran que la expresión del gen va quedando más restringida a la región distal de los dedos conforme la etapa del desarrollo aumenta, de modo que la distribución es más dispersa en el estadio S8, y más restringida a la región distal en el estadio S9. A pesar de esto, la región de localización del gen siempre abarca los 100µm distales del dedo.



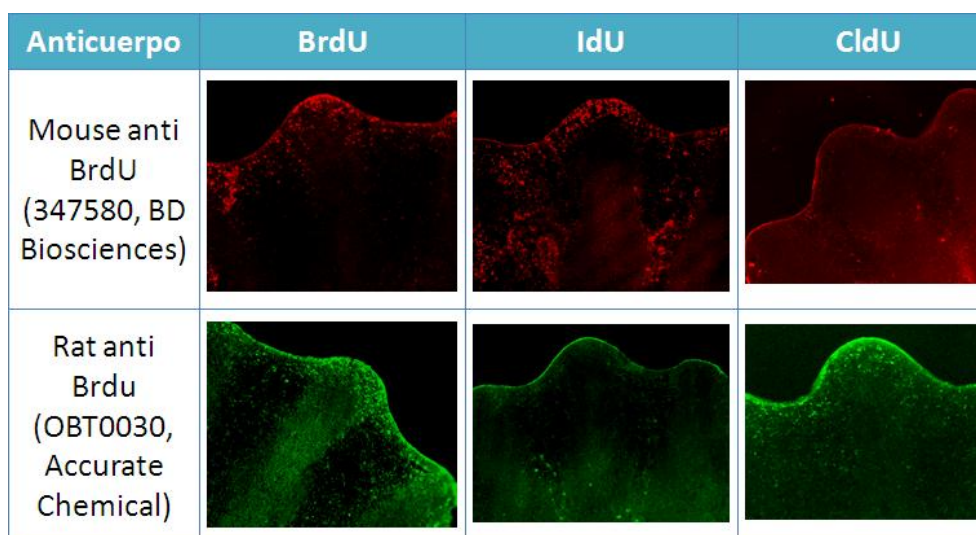
**Figura 16.** La expresión de N-myc en la extremidad varía durante las etapas del desarrollo analizadas. Hibridación *in situ* del gen N-myc. La expresión del gen pasa de estar dispersa en la región del interdígito en el estadio S8 (A), a quedar más restringida a la región distal y la punta de los dedos en los estadios S8<sup>+</sup>(B) y S9 (C).

La localización de N-myc coincide con el área en donde FGF8 se encuentra presente durante la formación y separación de los dedos, es decir, con la localización de la AER, principalmente en los estadios más avanzados. Esto nos sugiere que N-myc podría estar participando en la regulación de la proliferación durante la formación de los dedos. Se requieren más experimentos para confirmar esta hipótesis.

## Determinación de la duración del ciclo celular, mediante la incorporación al DNA de los análogos de la timidina

Inicialmente, se realizaron experimentos para probar diversas combinaciones de anticuerpos dirigidos contra los análogos de la timidina, con el fin de corroborar su eficacia y determinar si la identificación de los análogos era específica (Tabla 2). Se demostró que sólo las combinaciones reportadas en la bibliografía (40, 72, 75) identificaban al BrdU, como control positivo, e identificaban de manera específica al IdU o al CldU, sin presentar reacciones cruzadas desfavorables (fig. 17).

Anticuerpo	Concentración	BrdU	IdU	CldU
Mouse anti BrdU acoplado a Alexa 594 (A21304, Invitrogen)	1:200	+	+	+
Mouse anti BrdU (2272MBU, Accurate Chemical)	1:200	+	+	+
Mouse anti BrdU (347580, BD Biosciences)	1:200	+	-	+
Rat anti Brdu (OBT0030, Accurate Chemical)	1:150	+	+	-



**Figura 17.** Los anticuerpos empleados permiten el reconocimiento específico del IdU y CldU. Detecciones inmunohistoquímicas empleando los anticuerpos anti BrdU que presentan reacción cruzada con IdU o CldU, de manera específica, reportados en la bibliografía (40, 72, 75).

Durante los experimentos iniciales, se observó que la especificidad con la que los anticuerpos identificaban al CldU o al IdU, sin presentar reacciones cruzadas indeseadas, mostró ser altamente dependiente de variaciones en los protocolos de la detección inmunohistoquímica.

Debido a esto, se decidió realizar una curva de incorporación de IdU y CldU a diferentes concentraciones (0.5, 1, 5 y 10 µg/mL), y en diferentes condiciones. Esto permitió evaluar las concentraciones óptimas de análogo agregado al medio, el tiempo de incorporación del análogo, tiempo de hidrólisis por exposición al HCl 2N, concentración del anticuerpo, y tiempo de incubación con el anticuerpo, para efectuar la inmunodetección específica de cada uno de

los análogos. Se concluyó que las condiciones óptimas para la inmunodetección de IdU y CldU, sin que existan reacciones cruzadas inespecíficas para su identificación, son:

- \* Concentración de los análogos: tanto IdU como CldU, 10µg/mL;
- \* Tiempo de incubación: de preferencia no más de 1h en medio DMEM con cada uno de los análogos por separado;
- \* Hidrólisis del DNA con HCl 2N durante 30min a 37°C;
- \* Anticuerpo primario: incubación durante 16 – 24h a 4°C, a una concentración de 1:500, para la combinación de anticuerpos b. y c. mencionados en la sección de Metodología;
- \* Anticuerpo secundario: incubación durante 1.5h a temperatura ambiente, a una concentración de 1:1000, empleando los anticuerpos secundarios mencionados anteriormente.

Empleando estas condiciones se inició con los protocolos de administración de los dos análogos de la timidina a las extremidades en cultivo, siguiendo las dos estrategias mencionadas en la sección de metodología:

### **Metodología reportada**

Administración conjunta de IdU y BrdU, siguiendo el protocolo de Martynoga y colaboradores (40) mencionada en la sección de *Metodología*, para la determinación de la duración del ciclo celular. En este experimento se consideraron dos poblaciones marcadas:

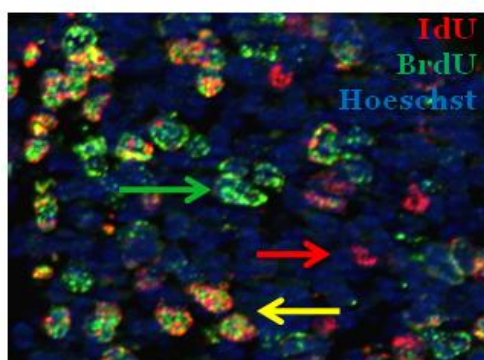
1. Aquellas que incorporaron sólo IdU (IdU<sup>+</sup>/BrdU<sup>-</sup>), que constituyen la población que atravesó por la fase S durante los 90 minutos en que se permitió la incorporación de este análogo, y que salió de esta fase después del tiempo total del experimento; y
2. Una población doblemente marcada (IdU<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>), que constituye el total de las células que estaban en fase S al final del experimento.

El experimento se repitió por triplicado para corroborar su reproducibilidad, y obtener valores promedio de las poblaciones marcadas. Empleando las ecuaciones I a VI se determinaron los siguientes resultados:

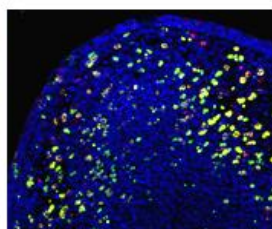
- \* Duración promedio de la fase S:  $1.21 \pm 0.06h$ , para las extremidades superiores; y  $1.19 \pm 0.09h$ , para las extremidades inferiores.
- \* Duración total promedio del ciclo celular:  $12.1 \pm 0.6h$ , para las extremidades superiores, y  $12.4 \pm 0.1h$ , para las extremidades inferiores.

Se consideró que el total de la población distal del dedo se encuentra en proliferación activa, por lo que el valor empleado para los cálculos, fue el valor del número de células totales presentes en los 100µm distales del dedo en desarrollo, calculado anteriormente: 821 células. Los resultados se muestran en la tabla 3 de la sección de *Apéndices*, y la figura 18.

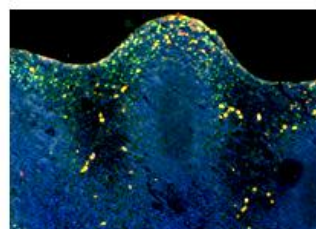
**A**



**B**



**C**



**Figura 18.** Incorporación de dos análogos de la timidina a extremidades en cultivo, empleando la metodología reportada en la bibliografía (40). Se observan células con marca de cada uno de los análogos de manera específica, y células que han incorporado ambos análogos. Cada una de estas marcas se cuantifica como se indica en la tabla 3 de la sección de *Apéndices*, para posteriormente realizar los cálculos de la duración del ciclo celular. **A.** Fotografía en aumento 40X, **B.** 20X, **C.** 10X.

Es muy importante resaltar que en esta metodología, el número de células que atravesó por una fase S, y que en el transcurso del experimento dejó esta fase para pasar a la fase G2, está considerada en el valor llamado Lc (Véase *Metodología*), lo que vuelve a esta metodología una excelente candidata para la determinación de la duración del ciclo celular de modelos dinámicos como el analizado en este trabajo, en donde las células no se mantienen proliferando indefinidamente, sino que algunas inician el proceso de diferenciación abandonando el ciclo celular.

A continuación, se muestra un ejemplo de los cálculos realizados para la determinación de la duración del ciclo celular, empleando esta estrategia:

$$Lc = IdU^+ / CIdU = 104$$

$$Sc = IdU^+ / CIdU^+ = 81$$

$$Ti = 1.5h$$

$$Pc = 821$$

$$Ti/Ts = Lc/Sc \quad \rightarrow \quad Ts = Ti/(Lc/Sc)$$

$$Ts = 1.5h/(104/81)$$

$$Ts = 1.2h$$

$$Ts/Tc = Sc/Pc \quad \rightarrow \quad Tc = Ts/(Sc/Pc)$$

$$Tc = 1.2h/(81/821)$$

$$Tc = 12.2h$$

### **Metodología propuesta**

Planteada en base a la metodología reportada por Martynoga y col. (40), pero con las variaciones mencionadas en la sección de *Metodología*. Se obtuvieron tres poblaciones, una marcada sólo con el análogo administrado inicialmente, una marcada sólo con el segundo análogo, y una doblemente marcada.

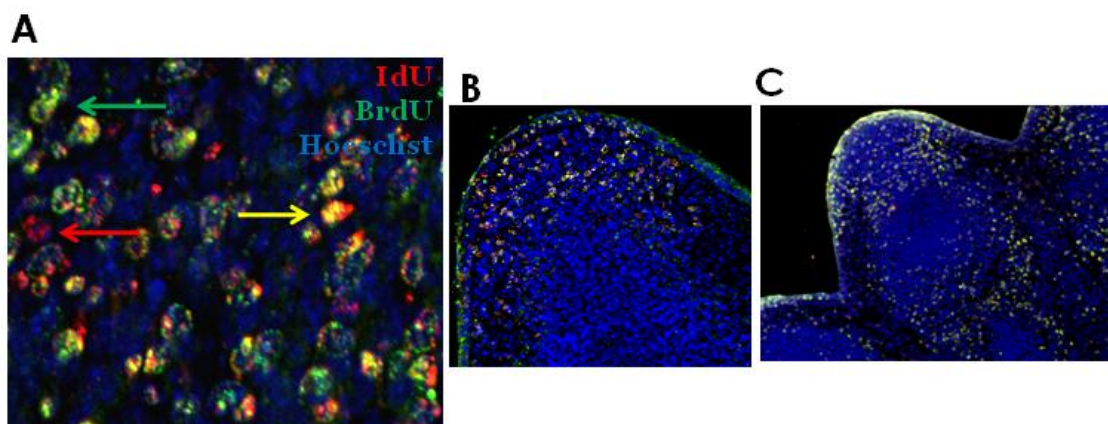
Nuevamente, el experimento se realizó por triplicado, para corroborar su reproducibilidad, y obtener valores promedio de las poblaciones marcadas. También, se consideró que el total de la población distal del dedo se encuentra en proliferación activa, por lo que el valor empleado para los cálculos, fue el valor del número de células totales presentes en los 100µm distales del dedo en desarrollo, calculado anteriormente: 821 células. Los resultados se muestran en la tabla 4 de la sección de *Apéndices*, y la figura 19.

Si se emplean las mismas fórmulas I a VI, mencionadas en la sección de metodología, y reportadas en la bibliografía (40) para el cálculo de la duración del ciclo celular, los resultados obtenidos son los siguientes:

Duración promedio de la fase S: 0.57 ± 0.2h.

Duración total promedio del ciclo celular: 6.38 ± 0.97h.





**Figura 19.** Incorporación de dos análogos de la timidina a extremidades en cultivo, empleando la metodología propuesta. Es posible identificar células con marca de cada uno de los análogos de manera específica, y células que han incorporado ambos análogos. **A.** Fotografía en aumento 40X, **B.** 20X, **C.** 10X.

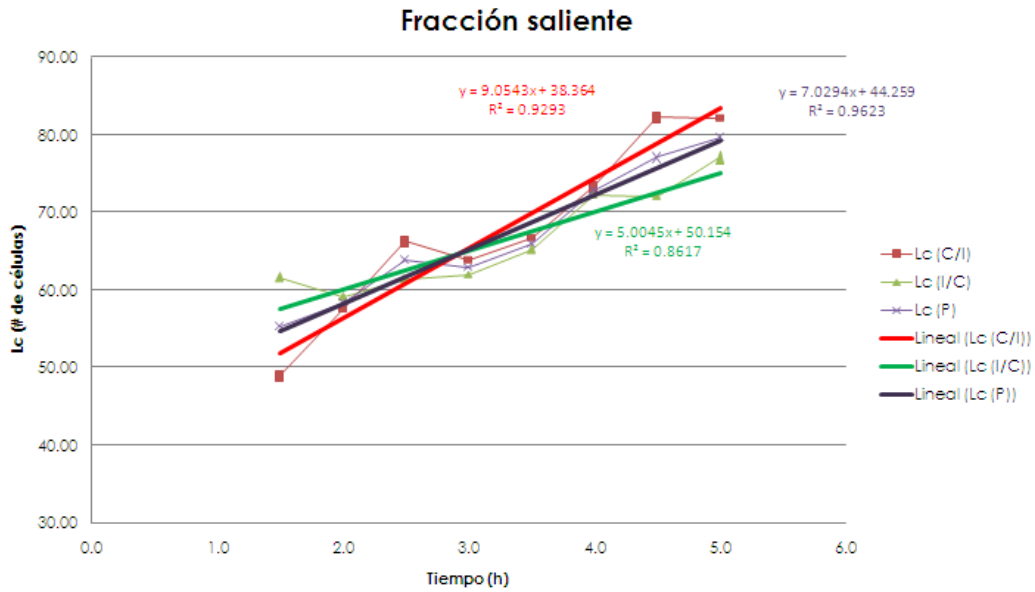
En este caso, no se consideraron las extremidades superiores e inferiores por separado, los datos obtenidos son el promedio de las determinaciones realizadas en extremidades inferiores y superiores de manera indistinta.

Para estos cálculos, el  $T_i$ , o tiempo en que se permite la incorporación del primer análogo de la timidina administrado, se consideró como 0.5h, en todos los casos. Esto debido a que fue el tiempo que las extremidades se incubaron con IdU (0.5h) o con CIdU (0.5h), inicialmente. La fracción saliente,  $L_c$ , se obtuvo restando a la población marcada con el primer análogo, el número de células doblemente marcadas; y la población en fase S al momento del experimento,  $S_c$ , se consideró como el total de células marcadas sólo con el segundo análogo.

Como puede observarse, la diferencia con respecto a la metodología reportada es muy grande. Sin embargo, en la metodología reportada (40), no existen intervalos que separen el tiempo de incorporación de uno u otro de los análogos empleados, sino que la incorporación es continua. Esta diferencia podría ocasionar que se subestimen posibles cambios que ocurran durante estos periodos de incubación en el medio sin análogo. Debido a esto, se consideró conveniente replantear la manera de calcular la duración del ciclo celular, a partir de los datos de la incorporación de dos análogos de la timidina en cultivo.

Para el nuevo cálculo, se propuso graficar el promedio de la fracción saliente  $L_c$ , contra el tiempo total del experimento (sumando el tiempo de incorporación de los análogos, y el tiempo de incubación sin análogo). De este modo, pudo determinarse, mediante regresión lineal, la fracción de células que sale de la fase S, por hora. Este valor corresponde al doble de la pendiente de la recta que se ajusta al comportamiento de los datos (la pendiente corresponde a un valor de 0.5h). Si determinamos el tiempo en que el 100% de la población ya atravesó por una fase S, podremos entonces determinar la duración aproximada del ciclo celular. Los resultados se observan en la tabla 5 de la sección de *Apéndices*, y la figura 20.

De acuerdo con el gráfico y tomando la pendiente de la recta como el número de células que transita por la fase S cada 0.5h, tendríamos que en una hora, salen de la fase S un promedio de 14 células. Si consideramos que el total de la población son las 821 células empleadas en cálculos anteriores, el gráfico nos indicaría que el 0.02% de las células salen de la fase S cada hora. Por lo tanto, el tiempo necesario para que el 100% de las células salgan de esta fase del ciclo celular, y por lo tanto, la duración aproximada del ciclo celular es de 58.9h.



**Figura 20.** Gráfico de la fracción saliente contra el tiempo. Se graficó el número de células que sale de la fase S contra el tiempo total del experimento. La pendiente de la recta indica el número de células que sale de la fase S cada 30 minutos.

Este resultado, está muy alejado de lo esperado, y aún, a la duración del ciclo celular reportada para diversos tipos celulares durante el desarrollo embrionario, y en la adultez (Tabla 1, de la sección de *Antecedentes*). Esto es debido, probablemente, a que el número de células que se encuentran en fase S durante un periodo de tiempo determinado, y que salen de la fase S en un periodo similar, está subestimado. Es necesario entonces emplear una metodología que nos indique la fracción de crecimiento de las células estudiadas, para compararla con los resultados obtenidos con el método propuesto, y para corroborar los datos obtenidos con la metodología reportada.

## Determinación de la duración del ciclo celular mediante el análisis de otros marcadores de proliferación

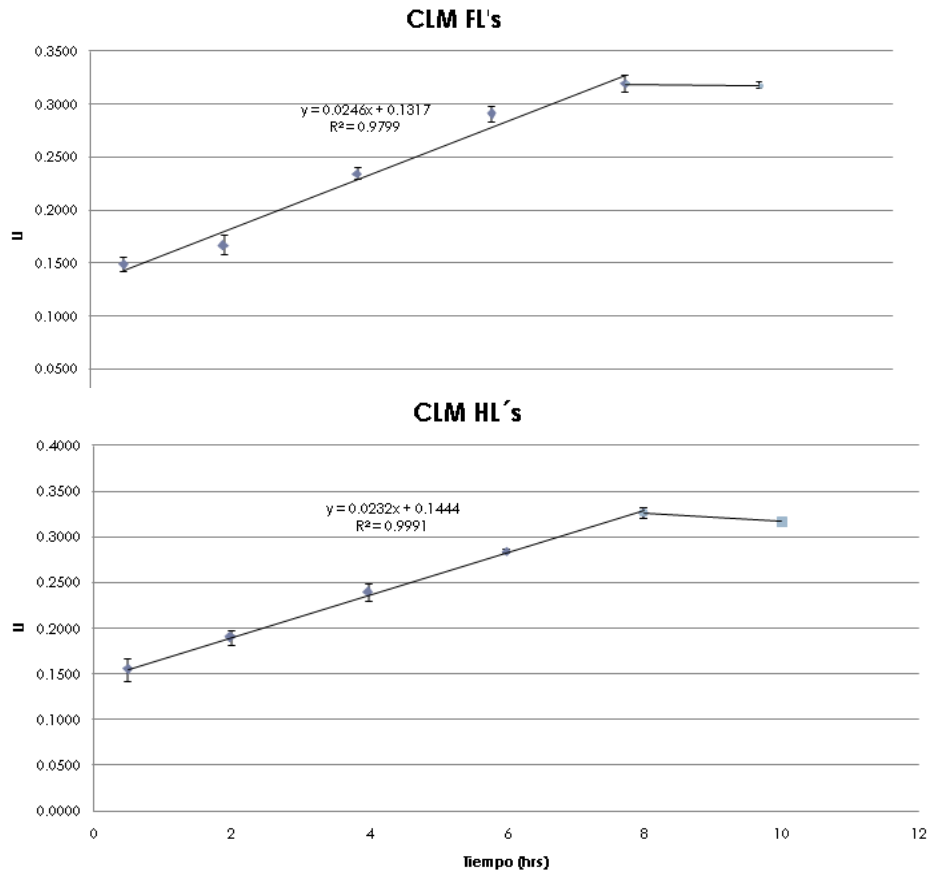
### Marcaje acumulativo con BrdU

El método del marcaje acumulativo con BrdU nos permite realizar el marcaje progresivo de las células que han atravesado por una fase de replicación del DNA, en un tejido (51). Los resultados se muestran en la tabla 6 de la sección de *Apéndices*, y la figura 21.

El experimento se realizó por triplicado, para corroborar su reproducibilidad, y obtener valores promedio de las poblaciones marcadas. Se consideró como el total núcleos, el total de células presentes en los 100µm distales del dedo en desarrollo, calculado anteriormente: 821 células.

De acuerdo a estos resultados, tanto en las extremidades superiores como en las inferiores, el número máximo de núcleos que adquieren la marca con BrdU con respecto al total de núcleos presentes (LI), se alcanza a las 8 horas. Este valor corresponde al LI máximo, y puede correlacionarse con la fracción de crecimiento del tejido, es decir, con el porcentaje de células que están dividiéndose en el tejido.

De este modo, según los resultados obtenidos, la fracción de proliferación (porcentaje de células que se encuentran proliferando, con respecto al total de células) de las extremidades superiores es: 31.99%, y de las extremidades inferiores: 32.76%.



**Figura 21.** Gráficas del valor de LI (número de núcleos que adquirieron la marca de BrdU, y por tanto atravesaron por al menos una fase S del ciclo celular) contra el tiempo. Se presentan las determinaciones realizadas en las extremidades superiores (FL's) y las extremidades inferiores (HL's).

Empleando los datos obtenidos de las gráficas anteriores, y el método propuesto por Nowakowsky y colaboradores (51), puede determinarse la duración de la fase S, y la duración total del ciclo celular. A partir de esto, se tiene:

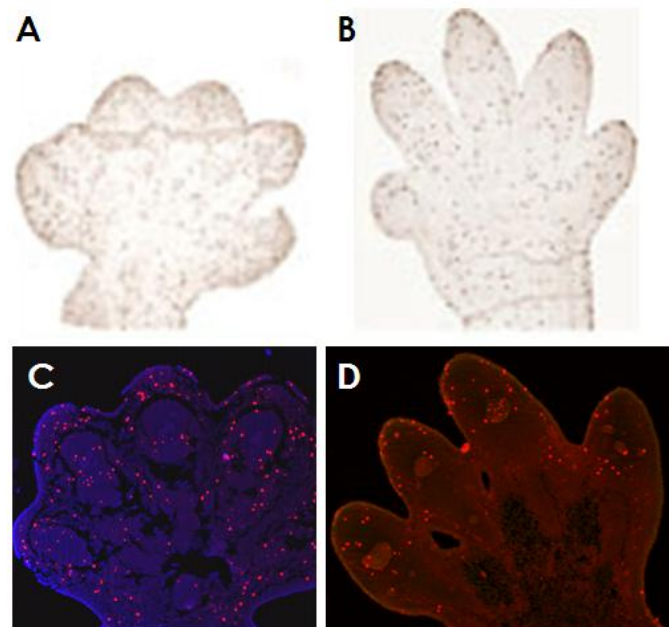
- \* Extremidades superiores  
 Duración de la fase S: 5.35h  
 Duración del ciclo celular: 13.35h
- \* Extremidades inferiores  
 Duración de la fase S: 6.22h  
 Duración del ciclo celular: 14.22h

Puede observarse que la duración de la fase S es mayor que en las metodologías empleadas previamente, esto puede deberse a que en este método, las células que abandonan la fase S para iniciar el proceso de diferenciación no son consideradas, debido a que, a pesar de haber abandonado el ciclo celular, conservan la marca de BrdU, esto puede generar una sobreestimación de la duración de la fase S y del ciclo celular.

**Determinación del porcentaje de mitosis marcadas**

El uso de esta metodología nos permitió calcular la duración total del ciclo celular, y la duración aproximada de cada una de las fases que lo conforman. Esto mediante la determinación del porcentaje de células que, además de estar en mitosis al momento del experimento, detectada por la presencia de la histona H3 fosforilada (pH3), han adquirido la marca de BrdU, es decir, han atravesado por un ciclo celular completo en el tiempo que abarca el análisis realizado.

Antes de iniciar con la colocación de estos marcadores, y por lo tanto, con la determinación del porcentaje de mitosis marcadas, fue necesario realizar la inmunodetección de cada uno por separado, y cerciorarse que el patrón obtenido era el esperado. Fue posible observar la señal clara en extremidades en estadios S8<sup>+</sup>/S9 (fig. 22, C y D), muy similar a la reportada en estudios anteriores (68) (fig. 22, A y B). Como puede observarse, la señal está distribuida ampliamente en toda el autómodo en el estadio S8<sup>+</sup>, y se restringe más hacia la región distal en el estadio más avanzado.



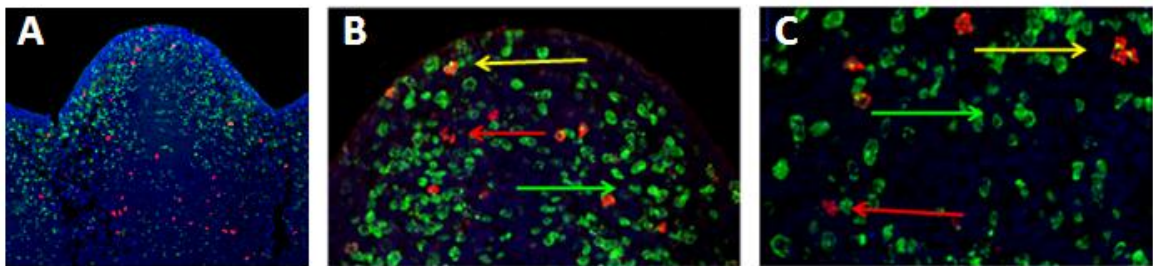
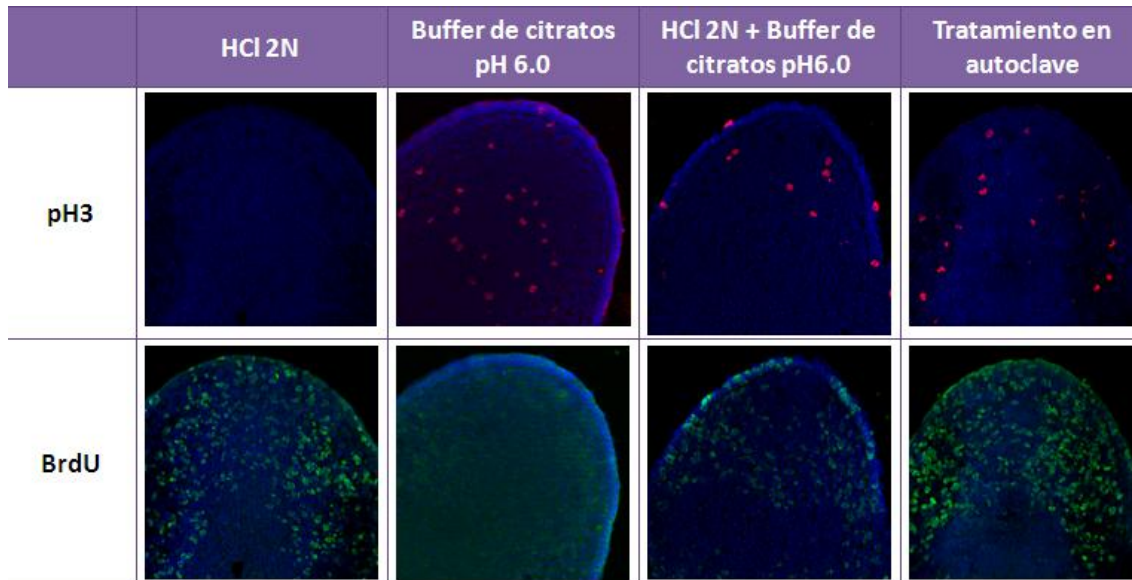
**Figura 22.** La metodología empleada para la exposición del antígeno permitió detectar la señal de la histona H3 fosforilada, similar a la reportada previamente (68). Inmunodetección de la histona H3 fosforilada en los estadios S8<sup>+</sup> (A y C), y S9 (B y D). Reporte previo [A y B (tomado de 68)], señal obtenida durante el desarrollo de este trabajo C y D.

Una vez establecidos los protocolos de inmunodetección para cada uno de los antígenos por separado, se procedió a implementar el protocolo para la colocación de la marca de las dos señales, para lo cual, se probaron todas las estrategias para exponer el antígeno, mencionadas en la sección de metodología, o la combinación de ellas.

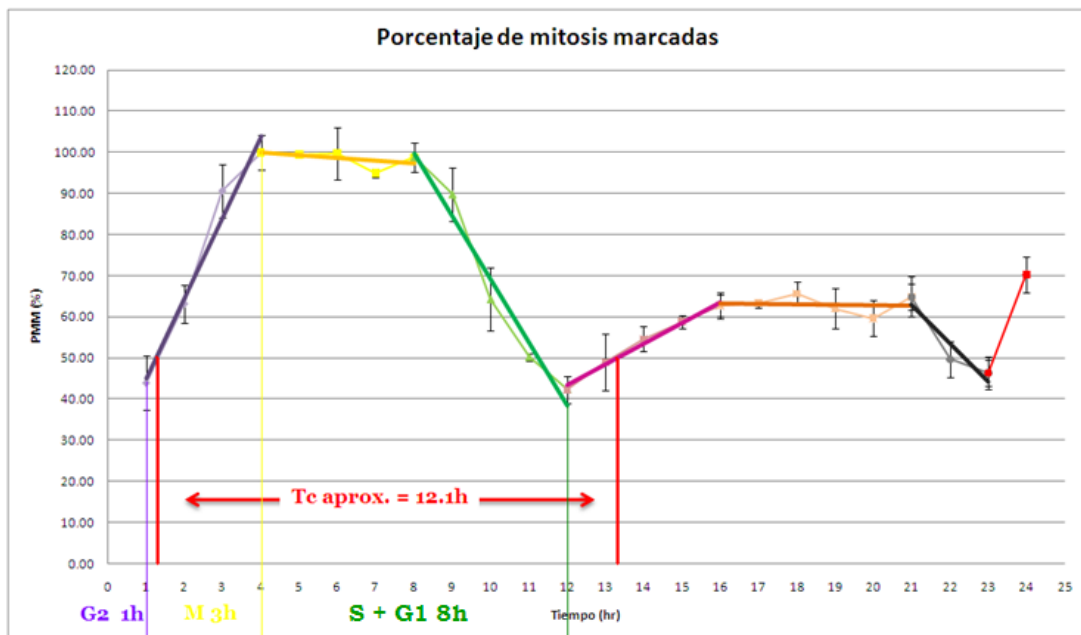
Se empleó entonces el protocolo de exposición del antígeno por calor y alta presión para realizar la determinación del porcentaje de mitosis marcadas. Los resultados se muestran en la tabla 7 de la sección de *Apéndices*, y la figura 23.

Graficando los datos de la tabla 7 (fig. 24), y empleando la metodología propuesta por Takahashi (95), si se determina el tiempo que tarda en completarse el intervalo entre dos puntos correspondientes de ciclos celulares secuenciales, por ejemplo, entre dos puntos del

50% del porcentaje de mitosis marcadas, se determina la duración total aproximada del ciclo celular, que en este caso, sería **12.1h** (fig. 24).



**Figura 23.** La señal óptima para la colocalización de la histona H3 fosforilada y el BrdU se obtiene con el tratamiento en autoclave para exponer el antígeno. **A, B y C** Fotografías de la colocalización del BrdU y pH3, en muestras tratadas en autoclave, y en magnificaciones 10X (**A**), 20X (**B**) y 40X (**C**). Las flechas amarillas señalan células con la doble marca, las rojas, células que tienen sólo la marca de la pH3, y las verdes, células que sólo adquirieron la marca del BrdU.



**Figura 24.** Gráfico que representa el porcentaje de mitosis marcadas contra el tiempo. Se muestra el porcentaje de mitosis marcadas con respecto al número total de mitosis presentes en el tejido al momento del análisis, durante 24 horas. El resultado se muestra racionalizando al 100% con respecto al valor máximo del porcentaje de mitosis, alcanzado a las 4 horas. PMM: porcentaje de mitosis marcadas; Tc: duración total aproximada del ciclo celular; G2: duración aproximada de la fase G2; M: duración aproximada de la mitosis; S + G1: duración aproximada de la suma de la fase S y la fase G1.

Si se sigue el análisis del gráfico obtenido, se tienen los siguientes valores para los parámetros del ciclo celular:

- \* Duración de fase G2: tiempo entre la administración del análogo y la aparición de la primera figura mitótica: 1h;
- \* Duración de M: Tiempo en que se alcanza el máximo del porcentaje de mitosis marcadas: 3h;
- \* Duración S+G1: intervalo que abarca desde que se alcanza el máximo de figuras mitóticas marcadas, hasta que se vuelve al porcentaje mínimo: 8h.

---

## *Discusión de los resultados*

---

El entendimiento de los procesos que llevan a la morfogénesis y desarrollo de las extremidades se ha utilizado como una herramienta para el análisis de la participación de diversas moléculas y vías de señalización durante la formación del embrión.

Actualmente existen dos propuestas principales que tratan de explicar cómo ocurre el desarrollo de los dedos, la adquisición de forma y su separación, para dar lugar a una extremidad con la morfología que todos conocemos.

La primera de ellas le brinda un papel central a la muerte celular interdigital, estableciendo que la extremidad se forma y crece en proporción equivalente en todo su eje distal, y la separación de los dedos ocurre más tarde en el desarrollo, gracias a un proceso de muerte masiva, de tipo apoptótica, del tejido interdigital.

La segunda propuesta, adoptada por nuestro grupo de trabajo, establece que es preferencialmente el crecimiento selectivo de los dedos, lo que lleva a la separación de los mismos, y no una muerte celular masiva; de modo que la muerte celular interdigital cumpliría con la función de limitar el crecimiento del tejido del interdígito, restringido ya de por sí por la falta de señales mitogénicas y de supervivencia. Estas señales se mantienen presentes en la punta de los dedos, permitiendo que éstos crezcan de manera diferencial al tejido del interdígito, y se proyecten, dando al autópodo su forma característica.

Siguiendo esta propuesta, y como se mencionó en la justificación de este trabajo, es importante determinar si existen divisiones celulares particularmente rápidas en la región distal del dedo en desarrollo, que contribuyan a que el crecimiento del dedo sea el factor preponderante en la separación de los dedos.

Se sabe que el crecimiento de la extremidad del embrión de ratón es asombrosamente rápido, su longitud se incrementa aproximadamente 1.3mm entre el día 9.5 y el día 12 (85).

Ocurre de un modo similar con la aparición y el desarrollo de los dedos, que empiezan a apreciarse hacia el día 12.5, y están prácticamente formados hacia el día 15, por lo que resulta importante determinar la duración del ciclo celular, y de esta manera determinar si la regulación de este proceso contribuye al crecimiento del dedo.

#### ***Estimación del número de células en la región distal de los dedos en desarrollo***

El primer paso para la realización de este trabajo fue establecer un valor estimado del número de células presentes en la región distal del dedo del embrión de ratón.

Como se mencionó en la sección de metodología y en la sección de resultados, esto se realizó empleando programas de computación y de análisis de imágenes, y haciendo uso de ecuaciones matemáticas simples. Para hacer uso posterior del valor obtenido, es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones fundamentales:

- \* Primero, la determinación del valor promedio del área del núcleo de las células en la región distal del dedo se realizó asumiendo que las células en esta región se encuentran en contacto estrecho unas con otras, y el citoplasma no es muy abundante, y que su tamaño no varía durante las etapas del desarrollo analizadas.
- \* Segundo, la densidad de las células en la región distal del dedo será siempre la misma en cualquier estadio de desarrollo estudiado, de modo que, sin importar en que etapa de desarrollo se tome, la cantidad de células siempre será muy similar, si se supone además, como ya se mencionó, que el tamaño de las células no cambia.
- \* La tercera consideración importante al obtener este valor es que el cálculo del número total de células es posiblemente una sub – estimación del número real de células presentes en la región, ya que se están empleando cortes de tejido para realizar los cálculos, es decir, sólo se están tomando en cuenta dos dimensiones; para hacer una estimación más cercana a la realidad debe considerarse la extremidad en 3 dimensiones.

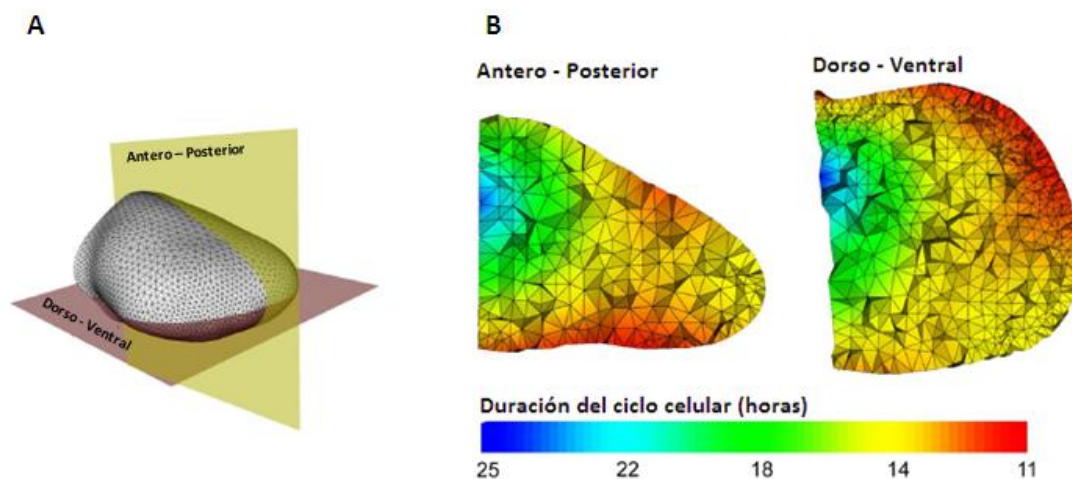
A pesar de lo establecido en las consideraciones anteriores, y a que el valor determinado no constituye un valor exacto, sino una estimación, resulta de gran utilidad para obtener los cálculos de la duración del ciclo celular mediante los métodos utilizados en este trabajo, debido a que dichos cálculos se basan en el conteo de células que presentan uno u otro marcador de proliferación, hecho en cortes de tejido, es decir, también en dos dimensiones.

#### ***Determinación de la población que se encuentra en proliferación activa en la extremidad en desarrollo***

Anteriormente se mencionó que existen modelos que tratan de explicar cómo ocurre el desarrollo y la morfogénesis de la extremidad. Un punto en común de estos modelos, es la propuesta de que la región distal de la extremidad se mantiene en estado proliferativo gracias al estímulo de diversas señales mitogénicas y de supervivencia (43, 65, 67, 85). Se habla de que una zona de aproximadamente 200 – 250 $\mu$ m, en el borde distal de la extremidad está proliferando activamente durante las etapas tempranas del desarrollo (65, 67, 85).

En estudios recientes, Boehm y colaboradores (6) desarrollaron un modelo tridimensional del primordio de la extremidad del embrión de ratón, para evaluar cómo ocurre la morfogénesis en etapas tempranas, y analizar la distribución y comportamiento de la población que se encuentra proliferando; esto les permitió determinar cuáles son los parámetros que se conjuntan para establecer la forma y la dinámica del desarrollo del primordio, como son, los movimientos orientados de las células, las divisiones celulares polarizadas, e incluso la migración celular (6).

Empleando la técnica desarrollada por Martynoga y colaboradores (40), también utilizada en el desarrollo de este trabajo, y técnicas avanzadas de microscopía en tiempo real y modelaje tridimensional por computadora, determinaron que el total de la población celular presente en el primordio se encuentra proliferando; sin embargo la tasa de proliferación es distinta, dependiendo del área en donde se localicen las células. De acuerdo a su trabajo, las células de la región distal, son las que se dividen más rápidamente, con respecto al resto del primordio, en donde la duración de las divisiones celulares van de aproximadamente 20 horas en la región centro – proximal, hasta aproximadamente 11 horas en la región distal posterior (fig. 25) (6).



**Figura 25.** Existen diferentes poblaciones que presentan variaciones en la duración del ciclo celular durante el desarrollo de la extremidad. Determinación de la duración del ciclo celular en una extremidad de ratón en estadio S4 (E11 – E11.25) empleando la técnica desarrollada por Martynoga y col., (40) en cortes de 7 $\mu$ m de extremidades en estadio S4, en orientación Antero-Posterior o Dorso-Ventral, desde la región más proximal hasta el borde distal. Se obtuvieron un total de 30 cortes que se emplearon para realizar una reconstrucción tridimensional de la extremidad, y un mapa 3D de la duración del ciclo celular en cada región que la conforma. **A.** Esquema de la orientación de las secciones virtuales de la extremidad analizadas; **B.** Mapa 3D de la extremidad en donde se indica la distribución de áreas con duraciones distintas del ciclo celular, mediante un código de colores. Modificado de 6.

En un trabajo similar, Welten y colaboradores (79), desarrollaron un modelo tridimensional de la extremidad del embrión de pollo, en estadios tempranos del desarrollo, para evaluar los patrones de expresión de genes involucrados en la especificación de los dedos. Mediante técnicas de hibridación *in situ* y técnicas de modelado por computadora, ellos encontraron que marcadores de proliferación, como la ciclina D2, el PCNA y N-myc, se encuentran presentes en toda la región distal del primordio en desarrollo, sugiriendo que todas las células presentes en esta área podrían estar proliferando activamente (79).

En nuestro grupo de trabajo, se considera que una situación similar puede presentarse durante el desarrollo y morfogénesis de los dedos, en las etapas del desarrollo analizadas en este trabajo. Además, en trabajos previos, e incluso en este mismo trabajo, es posible observar que, cuando se permite la incorporación de BrdU en extremidades en cultivo, por tiempos tan cortos como 30 ó 60 minutos, las células de las 100 – 200 $\mu$ m distales de los dedos son las que incorporan este análogo. Esto sugiere que son las células de esta región las que se están dividiendo de manera activa.



Para evaluar si esta situación es la que realmente se presenta, se analizó la presencia del antígeno Ki-67. Se sabe que este antígeno es un marcador endógeno de proliferación, y está presente sólo en las células que tienen el ciclo celular activo, y no en aquellas que han empezado a diferenciarse (62).

Como se muestra en los resultados, el antígeno Ki-67 está presente en la totalidad de las células de los 100µm distales del dedo, lo que sugiere que son estas células las que se dividen activamente. En las figuras 14 y 15, puede observarse que la intensidad con la que se observa la señal de este antígeno no es igual en todas las células, existen algunas cuya señal es más débil, y otras con una señal intensa. Esto puede deberse a que la concentración del antígeno no es la misma durante todas las etapas del ciclo celular, y no todas las células atraviesan por las mismas fases de este ciclo en un periodo de tiempo, es decir, la división celular es asincrónica.

Para corroborar la señal obtenida en la inmunodetección del antígeno Ki-67, y debido a que en la bibliografía no se encuentra reportado el patrón de localización de este antígeno en las extremidades en desarrollo, se consideró conveniente analizar la colocalización del Ki-67 con el BrdU, que se incorpora a las células durante la replicación del DNA en la fase S, y es un valioso indicador de que las células se están dividiendo (57).

Como se muestra en la figura 15, todas las células que incorporan BrdU tienen también la marca del antígeno Ki-67, lo que valida la hipótesis de que estas células están proliferando. Como se esperaba, no todas las células que son Ki-67<sup>+</sup> son BrdU<sup>+</sup>, ya que la distribución del Ki-67 es durante todas las fases del ciclo celular, mientras que el BrdU se encuentra sólo en las células que atravesaron por una fase S, que abarca sólo una fracción de la duración total del ciclo. Al igual que como ocurrió en el caso de la inmunodetección del Ki-67 por separado, la intensidad con que este antígeno está presente en las células es variable, y lo mismo ocurre con la marca del BrdU. También al igual que en el caso anterior, esto puede deberse a la asincronía del ciclo celular en las células estudiadas.

En base a estos resultados, la presencia del marcador de proliferación sugiere que la población localizada en los 100µm distales del dedo en desarrollo se encuentra proliferando de manera activa, en los tres estadios del desarrollo analizados en este trabajo.

Como posible candidato para efectuar la regulación de la proliferación en la región distal del dedo en desarrollo, se estudió la presencia del gen N-myc. En diversos trabajos se ha relacionado la presencia de este gen con la inhibición de la diferenciación celular (11, 18, 41, 53, 55, 63, 81), y se ha propuesto que, junto con c-myc, tiene un papel fundamental en la regulación de la morfogénesis de la extremidad (74) y en el proceso de separación de los dedos (55).

Como se mencionó anteriormente, la muerte celular programada de tipo apoptótico tiene gran importancia durante el desarrollo de la extremidad, y se considera trascendental durante la separación de los dedos. La posible participación de N-myc en este proceso se sugirió inicialmente gracias a un estudio de Van Bokhoven y colaboradores (106), que encontraron que la mutación heteróciga de N-myc en la región correspondiente a las cajas Myc, se relaciona con la aparición del síndrome de Feingold, caracterizado por atresias del esófago y duodeno, microcefálea, defectos cardiacos y, de relevancia para este estudio, sindactilia.

Por su parte, Ota y colaboradores (55) analizaron el papel de N-myc durante el desarrollo de la extremidad, principalmente en la inducción de la proliferación en estadios tempranos, y su función en la regulación de la PCD durante la separación de los dígitos. De acuerdo a sus

estudios, N-myc es requerido para regular el tamaño de las condensaciones precartilaginosas, la formación de las articulaciones, y la individualización de los dedos, durante el desarrollo de la extremidad. En base a sus hallazgos, proponen un modelo en donde N-myc provee de un suplemento constante de células mesenquimatosas, que se mantienen en continua proliferación gracias a los estímulos de los FGF's provenientes de la AER. Cuando N-myc no está presente, esta provisión de células no está disponible, de modo que los elementos esqueléticos resultantes tienen un tamaño reducido, y se presenta sindactilia. Los autores atribuyen la sindactilia a la ausencia de una fuente continua de células mesenquimatosas, destinadas a formar el tejido interdigital, que posteriormente morirá por apoptosis, para permitir la separación de los dedos.

En nuestro grupo, consideramos que la sindactilia no se debe a la falta de una fuente de células destinadas a desaparecer durante la separación de los dedos, sino que, en ausencia de N-myc, no hay células disponibles para dar origen, tanto al tejido interdigital, como a la población mesenquimatosas que dará origen a los dedos. De ese modo, y considerando el modelo propuesto por nuestro grupo para la morfogénesis de la extremidad, la proliferación de las células del mesénquima, en ausencia de N-myc, no sería suficiente para permitir el crecimiento de los dedos, y la adquisición del patrón normal de la extremidad.

Previamente, Welten y colaboradores (79) analizaron la expresión de *N-myc* en el primordio de la extremidad del embrión de pollo, encontrando que se expresa en todo el borde distal, particularmente en la región posterior. En este trabajo se analizó la expresión del gen en los estadios S8, S8<sup>+</sup> y S9, con la intención de comparar los patrones de expresión obtenidos, y determinar si existían diferencias dependientes del estadio de desarrollo.

Como se muestra en la figura 16, efectivamente existen diferencias en el patrón de expresión de este marcador. En estadios tempranos su expresión está más distribuida en toda la extremidad, y en áreas de tejido interdigital, lo que podría sugerir que en este estadio es necesario que toda la población ubicada en estas áreas estuviera proliferando para satisfacer las necesidades de crecimiento de la extremidad. En estadios más avanzados su expresión se restringe a la región distal de los dedos, e incluso desaparece del tejido del interdígito, lo que concuerda con la hipótesis de que en estos estadios la proliferación se limita a la región distal debido a la regresión de la AER y a la presencia de señales que estimulan la proliferación (FGF8) únicamente en la punta de los dedos (9, 12, 20, 43, 52, 67, 71, 85).

Estos resultados sugieren que *N-myc* podría estar involucrado en la regulación de la proliferación inducida por FGF8 en la región distal del dedo en desarrollo, sin embargo, más datos son necesarios para confirmar esta hipótesis. Por ejemplo, podría analizarse la expresión de este gen en extremidades que han sido expuestas a inhibidores de FGF8 o moléculas involucradas en su señalización (por ejemplo, las cinasas PI3K o MAPK), o podría silenciarse el gen y evaluar la expresión de FGF8.

#### ***Determinación de la duración del ciclo celular, mediante la incorporación al DNA de los análogos de la timidina***

Los análogos de la timidina se incorporan al DNA durante la replicación, en la fase S del ciclo celular, por lo que constituyen marcadores valiosos para determinar y cuantificar la población que se encuentra proliferando en un tejido.

Anteriormente se mencionó que puede considerarse que la relación de la duración de cualquier periodo del ciclo celular con respecto a otro periodo es igual a la relación entre el número de células presentes en cada uno de estos periodos. Por ejemplo, la relación de la

duración de la fase S con respecto a la duración total del ciclo celular, es igual a la relación del número de células que están en la fase S en un determinado momento, con respecto al total de células analizadas.

En base a lo anterior, Martynoga y colaboradores (40) desarrollaron una metodología para determinar la duración de la fase S y la duración total del ciclo celular, *in vivo*. Como ya se mencionó, es muy importante resaltar que este método sí toma en cuenta las células que abandonan la fase S para seguir con la siguiente fase del ciclo celular. Esto debido a que el modelo de la extremidad, analizado en este trabajo, es un modelo dinámico, en el que las células no se mantienen en proliferación por tiempo indefinido, sino que algunas células salen del ciclo celular para iniciar su diferenciación, y si estas células son aún consideradas en el conteo del número total de células que están proliferando (considerado como el número de células que incorporó al análogo de la timidina) el resultado será una sobreestimación del número de células proliferando, y un resultado falso de la duración total del ciclo celular.

En este trabajo, se establecieron las condiciones necesarias para realizar la inmunodetección de los análogos empleados en la estrategia reportada, en el modelo de la extremidad del embrión de ratón, y se reprodujo esta metodología para analizar la duración del ciclo celular en la punta de los dedos. Como se reportó en la sección de resultados, en la tabla 3 de la sección de *Apéndices* y la figura 18, fue posible determinar la duración del ciclo celular empleando esta estrategia, encontrándose que los valores obtenidos se encuentran dentro del promedio de los valores de la duración del ciclo celular, reportados previamente para diversos tejidos embrionarios (Tabla 1 de la sección de *Antecedentes*), y no son menores de 12 horas.

Los datos reportados (40) provienen de la determinación *in vivo* de la duración del ciclo celular, sin embargo, la inmunodetección de uno de los análogos (BrdU) no es específica. En estudios recientes Vega y Peterson (75) reportaron el uso de dos anticuerpos, diseñados inicialmente para la identificación del BrdU, que podían identificar de manera específica al IdU o al CldU. En nuestro grupo de trabajo se consideró conveniente emplear estos anticuerpos para realizar la inmunodetección específica de estos análogos en un método de determinación del ciclo celular de la punta de los dedos del embrión de ratón, *in vitro*. El análisis de los tejidos *in vitro* permite el uso de una gran variedad de técnicas de manipulación y análisis, para el estudio de la respuesta de las células ante diversos estímulos, por lo que el desarrollo de esta metodología resultaba conveniente.

Una vez establecidas las condiciones para la inmunodetección específica de cada uno de los análogos por separado, y para la colocalización de éstos en un mismo tejido, se procedió a realizar la determinación de la duración del ciclo celular. Sin embargo, el uso de dos análogos que podían identificarse de manera específica, y a la introducción de tiempos intermedios sin presencia de análogo, ocasionó que la población de células que corresponde a cada una de las fracciones consideradas se modificara:

- \*  $T_i$ , o tiempo en que se permite la incorporación del primer análogo administrado: 0.5h.
- \* La fracción saliente,  $L_c$ : la diferencia entre la población marcada con el primer análogo y la población doblemente marcada, ya que en la población de células que incorporan ambos análogos se encuentran las células que se mantuvieron la fase S desde la incorporación del primer análogo, hasta el final del experimento, es decir, hay que restar a las células que se marcaron con el primer análogo, las células que adquirieron también la marca del segundo análogo, y por lo tanto seguían en la fase S al final del experimento; y
- \* La población en fase S al momento del experimento,  $S_c$ : el total de células marcadas sólo con el segundo análogo. Esto, porque se espera que las células que se marcaron con el segundo análogo en los 30 minutos de exposición sean las que están en fase S justo en el

momento del experimento, y a que el segundo análogo ya no se encontraba disponible en el medio para ser incorporado.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 4 de la sección de *Apéndices*, los valores obtenidos resultaron estar muy por debajo del valor esperado, siendo prácticamente la mitad del valor obtenido por la metodología reportada. Se determinó entonces, que no era posible emplear los mismos cálculos reportados por la bibliografía (40) para realizar la determinación de la duración del ciclo celular con la metodología propuesta, por lo que, con la colaboración especial de un experto en el área (Dr. Gustavo Martínez Meckler), se decidió determinar la variación del número de células que sale de la fase S con respecto al tiempo. Esto, graficando los valores de la fracción Lc, con respecto al tiempo. Al graficar estos valores, y obtener por regresión lineal la ecuación de la recta resultante, puede obtenerse la variación (la pendiente de la recta) del número de células que salen de la fase S cada 30 minutos.

Como se muestra en la figura 20, se determinó que un promedio de 14 células sale de la fase S cada hora, es decir, el 0.02% del a población total, lo que llevaría a que la duración del ciclo celular fuera de 58.9 horas. Estos valores están evidentemente fuera de lo esperado, y lejos de los valores reportados para la duración del ciclo celular de tejidos embrionarios, por lo que se consideró necesario evaluar la fracción de proliferación por métodos alternativos, y al mismo tiempo, evaluar la duración del ciclo celular por métodos que permitieran validar o rechazar los datos obtenidos con la metodología reportada.

Además, esta metodología, al incluir intervalos de tiempo en que las células estuvieron cultivándose sin análogo, puede introducir un error que en los cálculos lleve a la sobreestimación de la duración del ciclo celular observada. Esto es, algunas las células que inicialmente incorporaron el primer análogo abandonaron el ciclo celular e incluso, debido a la acumulación de nuevas células en la región distal del dedo, pudieron salir de los 100 $\mu$ m distales analizados. De este modo, al realizar el conteo de células, pudieron existir células que no fueron consideradas por encontrarse fuera de la región de interés, pero que sin embargo, formaban parte del total de células que estaban proliferando. Esto pudo llevar a la determinación de un número menor de células proliferando por unidad de tiempo analizada, y por lo tanto, a la determinación errónea de la duración del ciclo celular estimada.

Podemos determinar entonces, que este método no fue el más adecuado para la determinación de la duración del ciclo celular, en el modelo estudiado, ya que necesita ajustes en la estrategia, tanto de administración de los análogos, como en el conteo de células y en los parámetros considerados para el cálculo, que permitan que se ajuste a la dinámica del tejido analizado.

### ***Determinación de la duración del ciclo celular mediante el análisis de otros marcadores de proliferación***

#### *Marcaje acumulativo con BrdU*

Este método, inicialmente propuesto por Nowakowski (51), como su nombre lo indica, consiste en marcar con BrdU, de manera consecutiva y acumulativa, la población de células que atraviesa por la fase S del ciclo celular en una población determinada, hasta que el total de la población tiene la marca. Como se muestra en la figura 10, cada dosis de BrdU marca únicamente la población de células que están proliferando en el momento de la administración. Graficando la proporción de células marcadas con respecto al tiempo, y obteniendo la ecuación de la recta resultante, pueden calcularse la duración de la fase S (Ts) y la duración total del ciclo celular (Tc).

Utilizando esta estrategia, fue posible determinar la duración del ciclo celular en la punta de los dedos, como se muestra en la tabla 6 de la sección de *Apéndices* y la figura 21. Nuevamente, los datos determinados se encuentran dentro del promedio de la duración del ciclo celular reportado para tejidos embrionarios, y no fueron menores de 12 horas. De modo que, a pesar de no ser exactamente iguales a los determinados con la administración de dos análogos de la timidina, reproduciendo la metodología de Martynoga y colaboradores (40), sí presentan similitud y se encuentran dentro de los valores posibles esperados.

La duración de la fase S es, sin embargo, diferente a la determinada anteriormente, esto podría deberse a que esta metodología, al basarse en la acumulación del BrdU en las células estudiadas, hasta que se saturan por completo, no considera aquellas células que incorporaron el análogo y abandonaron el ciclo celular, sino que considera en general todas las células que adquirieron la marca. Esto, como se mencionó anteriormente, puede llevar a una sobreestimación de la duración total del ciclo celular.

Con respecto a la fracción de crecimiento del tejido, determinada calculando el valor LI (LI = índice de marcaje = relación entre número de núcleos marcados y número total de núcleos) cuando se alcanza el número máximo de núcleos marcados, y empleando como total de núcleos en proliferación el valor del total de células presentes en los 100µm distales del dedo en desarrollo, fue de aproximadamente 32%.

Este resultado parece contradecir los resultados anteriores que asumen como correcta la hipótesis de que el total de las células presentes en los 100µm distales del dedo del embrión están proliferando de manera activa. Esto debido a que la fracción de proliferación, teóricamente, señala el porcentaje de células que están proliferando en un tejido en el momento del estudio. A pesar de esto, no pueden refutarse por completo, ninguno de los dos resultados. La evidencia que señala que el total de la población de la región distal del dedo en desarrollo está dividiéndose activamente está bien fundamentada, y el hecho de que la fracción de proliferación determinada por el método del CLM sea menor al 100% nos indica que en el periodo de tiempo estudiado (10 horas) sólo el 32% de la población atravesó por una fase S del ciclo celular.

Esto podría sugerir el resto de la población tiene un ciclo celular más lento, y que hay células presentes en esta región que no atravesaron por la fase S en las 10 horas del análisis. Boehm y colaboradores (6), en su análisis de la distribución y el comportamiento de la población en proliferación en el primordio de la extremidad de ratón, determinaron que existen al menos 4 poblaciones distintas, con variaciones en la longitud del ciclo celular que van desde las 11 hasta las 25 horas, aproximadamente. Las poblaciones con ciclos celulares más rápidos fueron ubicadas en las regiones distal y posterior del primordio, y la longitud del ciclo celular mostró un incremento conforme las células se volvían más centrales y proximales (6).

De modo similar, cuando se realizó la inmunodetección del BrdU para determinar la fracción LI, las células con la marca del BrdU se localizaron en la región distal del dedo, y las células que menor marca adquirieron, o que no presentaron marca alguna, fueron las células localizadas en la región media – proximal.

Como puede observarse, el 32% obtenido como fracción de crecimiento, está muy lejos del valor de 0.02% de las células saliendo de la fase S cada hora, lo que hace suponer que el método propuesto para la determinación del ciclo celular empleando dos análogos de la

timidina en cultivo, detecta una proporción menor de células que están proliferando, y por lo tanto, resulta en una estimación errónea de la duración del ciclo celular.

#### *Determinación del porcentaje de mitosis marcadas*

En este trabajo, se utilizó BrdU para marcar las células que han pasado por un proceso de replicación, y se reemplazó el conteo de figuras mitóticas por la inmunodetección de la histona H3 fosforilada, cuya presencia es un claro indicador de que una célula está atravesando por el proceso de la mitosis. Cuando se grafica el MLI (relación de figuras mitóticas marcadas, con respecto al número total de figuras mitóticas) con respecto al tiempo, y se analiza el gráfico obtenido, pueden determinarse los diversos parámetros del ciclo celular.

De acuerdo a la tabla 7 de la sección de *Apéndices* y a la figura 24, pudo determinarse que la duración total del ciclo celular fue de aproximadamente 12 horas. Nuevamente, se encuentra dentro del promedio esperado para un tejido embrionario, y va en contra del resultado obtenido con la metodología propuesta para la determinación de la duración del ciclo celular mediante la incorporación de dos análogos de la timidina en cultivo.

#### *Análisis y comparación de los distintos métodos empleados para la determinación de la duración del ciclo celular*

En este trabajo, se emplearon cuatro metodologías diferentes para la determinación de la duración del ciclo celular en la región distal del dedo de ratón en desarrollo. A pesar de que por los cuatro métodos se obtuvieron resultados distintos, tres de ellos entran en lo que podría considerarse como el promedio de duración del ciclo celular esperado para un tejido embrionario, y los datos obtenidos podrían utilizarse para determinar un intervalo de tiempo que puede sugerirse como válido para la duración del ciclo celular de las células de los 100µm distales de los dedos de embrión de ratón en estadios S8-S9.

Li y colaboradores (36), realizaron un análisis acerca de la homogeneidad de la longitud del ciclo celular en la corteza en formación del cerebro del ratón, y compararon diversas metodologías para la determinación de este parámetro. De acuerdo a su análisis, la determinación de la duración del ciclo celular por la incorporación de análogos de la timidina (incluidos el CLM y la incorporación diferencial de dos análogos), provee el valor de la duración del ciclo celular más lento, debido a que requiere que todas las células, incluso las más lentas, adquieran la marca de los análogos durante la fase S (36). En contraste, la determinación de la duración del ciclo celular por el PLM nos da un estimado del valor mínimo de la duración del ciclo celular, ya que determina el tiempo que las células con ciclo celular más rápido (las más adelantadas) requieren para pasar de una mitosis a otra (36).

Ambas determinaciones se ven afectadas por todos los factores que determinan la eficacia de la inmunodetección de los análogos de la timidina, y que se mencionaron anteriormente, por lo que siempre existe un pequeño margen de error que deberá considerarse, y que conviene corregir mediante la identificación de otros marcadores de proliferación, o mediante el cálculo de los parámetros del ciclo celular por diferentes métodos.

Si se realizara una comparación de los valores obtenidos mediante las tres estrategias que brindaron un resultado posible, y se obtuviera un promedio de estos valores, podríamos proponer que la duración del ciclo celular en la región distal de los dedos del embrión del ratón se encuentra en un intervalo de aproximadamente:

$$\underline{13.01 \pm 0.96h}$$

Sin embargo, la variabilidad y la diferencia entre la fracción de proliferación determinada por el CLM y los marcadores de proliferación analizados, podrían sugerir que existe más de una población con diferentes longitudes de su ciclo celular, que se distribuyen de manera asincrónica en el dedo. Para evaluar esto, sería necesario dividir el dedo en varias regiones, y determinar la longitud del ciclo celular de cada una de ellas, por más de un método y de preferencia considerando los tres ejes del crecimiento.

En cuanto a la cuarta metodología, la determinación de la duración del ciclo celular mediante la incorporación de dos análogos de la timidina en cultivo, se evidenció que no brindó resultados reales, que se obtuvo una subestimación de la proporción de células que se encuentran proliferando en el tejido, y que por lo tanto no puede emplearse para determinar la duración del ciclo celular de manera confiable. Esto debido principalmente, a que la identificación específica de los dos análogos en cultivo resulta sumamente variable y dependiente de las condiciones de la inmunodetección; no es posible realizar una identificación específica si la concentración de los análogos se incrementa en la célula, y no es posible obtener la fracción correcta de proliferación sin incrementar la concentración del análogo en la célula. Probablemente esta situación sea resultado de la incorporación de los análogos en cultivo, ya que *in vivo*, existen mecanismos de aclaramiento de la circulación, tanto de la madre como del embrión, que probablemente regulan que la incorporación a las células ocurra en una dinámica distinta.

No se descarta, sin embargo, que pueda establecerse una metodología para evaluar la duración del ciclo celular *in vitro*, lo que traería la ventaja de poder manipular los tejidos de diversas maneras para analizar su respuesta ante diferentes estímulos. Para ello podría emplearse otra combinación de análogos de la timidina que pudieran identificarse en las células por métodos diferentes. Por ejemplo, podría emplearse el análogo conocido como 5 – etinil – 2' – deoxiuridina (EdU), que es un análogo de la timidina que contiene un grupo etinil conjugado al carbono 5 del anillo de pirimidina. Este análogo puede conjugarse directamente a fluoróforos, o ser detectado mediante reacciones químicas que no dependen de anticuerpos. De este modo, se evitarían las reacciones cruzadas inespecíficas e indeseables.

Si se deseara determinar cuál de los métodos empleados es el más adecuado para el análisis de la duración del ciclo celular en el modelo estudiado, podría sugerirse que el método desarrollado por Martynoga y col. (40), es el más adecuado por considerar los parámetros más importantes, como son:

- \* El número de células que se encuentra proliferando al momento del análisis (fracción Sc, que determina las células que incorporaron BrdU –segundo análogo- en los 30 minutos finales del experimento);
- \* El número de células que abandona la fase S durante el experimento (fracción Lc, que adquiere la marca del IdU –primer análogo-, pero no se mantiene en la fase S suficiente tiempo como para también adquirir la marca del segundo análogo, sino que transita hacia la fase G2). La consideración de este parámetro es fundamental en el análisis de la duración del ciclo celular de la extremidad en desarrollo, debido a que es un modelo dinámico en el que, además de haber células proliferando, hay células que dejan el ciclo celular para iniciar el proceso de diferenciación;
- \* El número total de células analizadas (valor Pc);
- \* La duración de la fase S (valor Ts); y
- \* La duración total del ciclo celular (valor Tc).

A pesar de ser el más adecuado, la determinación de la duración del ciclo celular aún podría ser más precisa. El valor determinado por esta metodología es un valor determinado

en un análisis poblacional de células, mientras que un valor determinado en una célula única sería el ideal. Esto podría ser posible si, por ejemplo, se contara con marcadores de las distintas fases del ciclo celular, fusionados a proteínas fluorescentes, que pudieran ser analizados *in vivo* y en una célula única mediante técnicas de microscopía avanzada.

Con la realización de este trabajo se mostró entonces, que la hipótesis propuesta inicialmente no resultó ser verdadera, y no hay ciclos celulares particularmente rápidos presentes en la región distal del dedo en desarrollo, que pudieran contribuir al crecimiento acelerado de esta estructura. Resta sin embargo, mucho trabajo por hacer para determinar cuál es el mecanismo que lleva a que el dedo crezca a la velocidad observada, y cuáles son los fenómenos que permiten la separación de los dedos.

Para dar luz acerca de estas preguntas, podrían utilizarse estrategias que se han empleado recientemente para determinar los mecanismos que llevan a la proyección y adquisición de forma del primordio (5, 6, 19, 82), por ejemplo, técnicas de microscopía en tiempo real, e incorporación a la célula de marcadores de membrana que permiten analizar los movimientos celulares; así se ha demostrado que son los movimientos celulares dirigidos, la adquisición de polaridad de las células y las divisiones en planos polarizados, lo que lleva a la elongación y morfogénesis del primordio (5, 6, 19, 82). Se ha sugerido también que la división celular ocurre en todo el primordio y no sólo en los bordes distales, y eso permite que se adquiera una estructura con la forma que le caracteriza, y no una estructura esférica (6). No puede descartarse que fenómenos similares se presenten durante la elongación y morfogénesis de los dedos, por lo que resultaría sumamente conveniente analizar estos fenómenos en el autópodo.

Metodologías similares, y el uso de inhibidores enzimáticos, podrían emplearse para determinar cuáles son las moléculas que participan en la señalización de los fenómenos que permiten el crecimiento y la adquisición de forma de los dedos. Con esta información podría empezar a tomar forma el enorme rompecabezas que constituye el modelo de la morfogénesis de la extremidad.

---

## *Conclusiones*

---

1. Se estimó el número de células presentes en la región distal (100 $\mu$ m) del dedo del embrión de ratón, calculado mediante el análisis de imágenes bidimensionales de cortes de tejido fijados en parafina. Se determinó un valor estimado de aproximadamente 821 células, y se utilizó este valor en los cálculos posteriores para la determinación de la duración del ciclo celular.
2. Se determinó la distribución de la población que se encuentra proliferando activamente en la región distal de los dedos en desarrollo, mediante la identificación del marcador de proliferación Ki-67. Estos resultados indican que las células presentes en los 100 $\mu$ m distales se encuentran proliferando activamente.
3. Se encontró que N-myc podría ser un posible candidato para efectuar la regulación de la proliferación celular inducida por FGF8 en la región distal del dedo en desarrollo.



4. Se estimó que la duración del ciclo celular en la región distal (100 $\mu$ m) del dedo del embrión de ratón es en promedio  $13 \pm 1$ h. Esto tomando en cuenta los datos obtenidos por tres métodos distintos: incorporación al DNA de dos análogos de la timidina, *in vivo*; marcaje acumulativo con BrdU, y determinación del porcentaje de mitosis marcadas. Estos resultados contradicen la hipótesis inicial, que proponía la existencia de ciclos celulares particularmente rápidos (menores de 12 horas) en la región distal del dedo en desarrollo, que favorecerían el crecimiento acelerado de esta estructura.

---

## Perspectivas

---

1. Establecer un protocolo que permita determinar la duración del ciclo celular *in vivo*, empleando los análogos de la timidina que pueden identificarse de manera específica (IdU y CldU), y determinar si la metodología propuesta por la bibliografía es reproducible empleando estos análogos.
2. Establecer un protocolo para la determinación de la duración del ciclo celular *in vitro*, empleando un análogo de la timidina que pueda identificarse mediante la inmunodetección con anticuerpos (BrdU, IdU, o CldU), y un análogo de la timidina cuya identificación pueda realizarse por métodos independientes de anticuerpos (EdU).
3. Determinar si en el dedo en desarrollo existen poblaciones con duraciones del ciclo celular variables. Delimitar regiones específicas del dedo, y determinar la duración del ciclo celular de cada una de ellas para comparar los resultados.
4. Realizar la determinación de la duración del ciclo celular de manera diferencial en el área de proliferación activa del dedo en desarrollo, y el tejido del interdígito. Esto, para comparar los datos obtenidos y evidenciar si existen diferencias en la tasa de crecimiento de una u otra área. Resultados positivos validarían el modelo de morfogénesis de los dedos, que apoya la teoría de que es el crecimiento, y no la muerte celular, el mecanismo principal que dirige la separación de los dedos.
5. Analizar mediante experimentos con inhibidores enzimáticos cuáles son las posibles moléculas que están involucradas en la señalización del crecimiento y la morfogénesis de los dedos.
6. Analizar mediante técnicas de microscopía avanzada, e incorporación de marcadores de membrana, los comportamientos celulares que permiten la elongación y morfogénesis de los dedos. Comparar si son similares a los comportamientos celulares propuestos para la elongación y morfogénesis del primordio.

---

# Bibliografía

---

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K, y Watson, J. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, 1994.
2. Alles, A.J., y Sulick, K., K. Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as pathogenetic mechanism. *Teratology*, 40: 163 - 171, 1989.
3. Artus, J., y Cohen - Tannoudji, M. Cell cycle regularion during early mouse embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 282: 78 - 86, 2008.
4. Bastida, M., Sheth, R., y Ros, M. A BMP - Shh negative - feedback loop restricts Shh expression during limb development. *Development*, 136: 3779 - 3789, 2009.
5. Bénazéraf, B., Francois, P., Baker, R., Denans, N., Little, C., y Pourquié, O. A random cell motility gradient downstream of FGF controls elongation of an amniote embryo. *Nature*, 466: 248 - 252, 2010.
6. Boehm, B., Westerberg, H., Lesnicar-Pucko, G., Raja, S., Rautschka, M., Cotterell, J., Swoger, J., y Sharpe, J. The role of spatially controlled cell proliferation in the limb bud morphogenesis. *PLoS Biology* 8(7): e1000420, 2010.
7. Calegari, F., Haubensak, W., Hauffner, C., y Huttner, W. Selective lenghtening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *The Journal of Neuroscience*, 25 (28): 6533 - 6538, 2005.
8. Capdevila, J. e Izpisúa - Belmonte J. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Cell Developmental Biology*. 17: 87 - 132, 2001.
9. Capdevila, J., Tsukui, T., Rodríguez-Esteban, C., Zappavigna, V., y Izpisúa-Belmonte, J.C. Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2, and distal antagonist of BMP's by Gremlin. *Mollecular Cell*, 4: 839 - 849, 1999.
10. Coffman, J. Cell cycle development. Meeting review. *Developmental Cell*, 6: 321 - 327, 2004.
11. Cole, M.D., y McMahon, S.B. The myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*, 18: 2916 – 2924, 1998.
12. DeVore, D., Horwitz, H., y Stern, M. An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migration of the sex myoblast in the *C. elegans* hermaphrodites. *Cell*, 83: 611 - 620, 1995.
13. Dolznig, H., Bartunek, P., Nasmyth, K., Müllner, E., y Beug, H. Terminal differentiation of normal chicken erythroid progenitors: shortening of G1 correlates with loss of D cyclin/cdk4 expression and altered cell size control. *Cell Growth and Differentiation*, 6: 1341 - 1352, 1995
14. Downs, K.M., Martin G.R., y Bishop, J.M. Contrasting patterns of myc and N-myc expresion during gastrulation of mouse embrio. *Genes and Development*, 3:860 – 869, 1989
15. Fujita, S. Kinetics of cellular proliferation. *Experimental Cell Research* 28: 52-60, 1962.
16. Gerdes, J., Hilmar, L., Baisch, H., Wacker, H., Schwab, U., y Stein, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation - associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*, 133 (4): 1710 - 1715, 1984.
17. Graham, C., y Morgan, R. Changes in the cell cycle during earl amphibian development. *Developmental Biology*, 14: 439 - 460, 1966.
18. Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., y Eisenman, R.N. The Myc/Mad/Max network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual Review of Cell Development and*

19. Gros, J., Hu, J.K., Vinegoni, C., Feruglio, P.F., Weissleder, R., y Tabin, C.J. WNT5A/JNK and FGF/MAPK pathways regulate the cellular events shaping the vertebrate limb bud. *Current Biology*, 20: 1993 - 2002, 2010.
20. Hernández - Martínez, R., Castro - Obregón, S., y Covarrubias, L. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*, 136: 3669 - 3678, 2009.
21. Hernández - Martínez, R., y Covarrubias, L. Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. *Development, Growth and Differentiation*, 53: 245 - 258, 2011.
22. Hinegardner, R.T., Rao, B., y Feldman, D.E. The DNA synthetic period during early development in the sea urchin. *Experimental Cell Research*, 36: 53-62, 1964.
23. Hockman, D., Cretekos, C., Manson, M., Behringer, R., Jacobs, D., e Illing, N. A second wave of Sonic hedgehog expression during the development of the bat limb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (44): 16982 - 16987, 2008.
24. Hurlin P.J. N-myc functions in transcription and development. *Birth Defects Research*, 75: 340 – 352, 2005
25. Jacobson, M., Weil, M., y Raff, M. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347 - 354, 1997.
26. Johnson, G., y Walker, C. Cyclines and cell cycle check points. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39: 295 - 315, 1999.
27. Johnson, R., y Tabin, C. Molecular models for vertebrates limb development. *Cell*, 90: 979 - 990, 1997.
28. Kane, D., y Kimmel, C. The zebrafish midblastula transition. *Development*, 119: 447 - 456, 1993.
29. Kauffman, S.L. An autoradiographic study of the generation cycle in the ten-day mouse embryos neural tube. *Experimental Cell Research* 42: 67-73, 1966.
30. Keller, R. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science*, 298: 1950 - 1954, 2002.
31. Kimmel, C., Warga, R., y Kane, D. Cell cycles and clonal strings during formation of the zebrafish central nervous system. *Development*, 120: 265 - 276, 1994.
32. Klint, P., y Claesson - Welsh, L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Frontiers in Biosciences*, 4: 165 - 177, 1999.
33. Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Arruda, E., Kathiriya, I., Rong, M., Hui, C., Srivastava, D., Bruneau, B. Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern in the mouse limb and heart. *Nature genetics*, 38: 175 - 183, 2006.
34. Kraus, P., Fraidenaich, D., y Loomis, C.A. Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mechanical Development*, 100: 45 - 58, 2001
35. Larsson, L.G., y Henriksson, M.A. The yin and yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as a targets of therapy. *Experimental Cell Research*, 316: 1429 – 1437, 2010
36. Li, C., Hayes, N., y Nowakowski, R. Local homogeneity of cell cycle length in developing mouse cortex. *The Journal of Neuroscience*, 17(6): 2079 - 2087, 1997.
37. Macias, D., Ganán, Y., Ros, M.A., y Hurlé, J.M. In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF2 and FGF4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anatomy and Embryology*, 193: 533 - 541, 1996.
38. Mandyam, C., Harburg, G., y Eisch, J. Determination of key aspects of precursors cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. *Neuroscience*, 146: 108 - 122, 2007.

39. Marcu, K.B., Bossone, S.A. y Patel, A.J. Myc function and regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 809 – 858, 1992.
40. Martynoga, B., Morrison, H., Price, D., y Mason, J. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region - specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Developmental Biology*, 283: 113 - 127, 2005.
41. Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S., y Sedivy, J.M. Phenotypes of C-myc deficient rat fibroblasts isolated by target homologous recombination. *Cell Growth and Differentiation*, 8: 1039- 1048, 1997
42. Mc Auley, A., Werb, Z., y Mirkes, P. Characterization of the unusual rapid cell cycles during rat gastrulation. *Development*, 117: 873 - 883, 1997.
43. Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M.E., Martínez, C., Ros, M.A., y Torres, M. Oposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development*, 127: 3961 - 3970, 2000.
44. Mlodzik, M. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissues polarity and vertebrate gastrulation? *Trends in Genetics*, 18: 564 - 571, 2002.
45. Montavon, T., LeGarrec, J.F., Kerszberg, M., y Duboule, D., Modeling Hox gene regulation in digits: reverse colinearity and the molecular origin of thumbless. *Genes Development*, 22: 346 - 359, 2008.
46. Murakami, M., y Vande Woude, G. Analysis of the early embrionic cell cycles of Xenopus; regulation of cell cycle length by Xe - wee1 and Mos. *Development*, 125: 237 - 248, 1998.
47. Murphy, M.J., Wilson, A., y Trumpp, A. More than just proliferation: Myc functions in stem cells, *Trends of Cell Biology*, 15: 128 – 137, 2005
48. Niswander, L. Pattern formation: old models out on a limb. *Nature Reviews*, 4: 131 - 143, 2003.
49. Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., y Martin, G.R. FGF4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75, 579 - 587, 1993.
50. Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S., y Saito, T. Retinoi acid induces polarizing activity but it's unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature*, 350: 83 - 86, 1991.
51. Nowakowski, R., Lewin, S., y Miller, M. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology*, 18: 311 - 318, 1989.
52. Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., y Noji, S. The mesenchimal factor, FGF10, initiates and mantain the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, 124: 2235 - 2244, 1997.
53. Okubo, T., Knoepfler, P.S., Eisenman, R.N. y Hogan, B.L. Myc plays an essential role during lung development, as a dosage – sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation. *Development*, 132: 1363 – 1374, 2005
54. Oren, M. Regulation of p53 tumor suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36031, 1999.
55. Ota, S., Zhou, Z.Q., Keene, D., Knoepfeler, P., y Hurlin, P. Activities of N-myc in the developing limb link control of skeletal size with digit separation. *Development*, 134: 1583 - 1592, 2007.
56. Quastler, H., y Sherman, F. Cell population kinetics in the intestinal population of the mouse. *Experimental Cell Research*, 17: 420 - 438, 1959.
57. Roa, J.C. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. *Gastroenterología Latinoamericana*, 14 (3): 195 – 199, 2003

58. Rodríguez-León, J., Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Santesteban, E., y Hurle, J.M. Retinoic Acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nature Cell Biology*, 1: 125 - 126, 1999.
59. Salas - Vidal, E., Valencia, C. y Covarrubias, L. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limbs autopod morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 220 (4): 295 - 306, 2001.
60. Sánchez, Y., Wong, C., Thoma, R., Richman, R., Wu, Z., Piwnica, W., y Elledge S. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through Cdc25. *Science*, 277: 1497, 1997.
61. Sausedo, R.A., Smith, J.L., y Schoenwolf, G.C. Role of nonrandomly oriented cell division in shaping and bending of the neural plate. *Journal of Comparative Neurology*, 371: 473 - 488, 1997.
62. Scholzen, T., y Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown, review. *Journal of Cellular Physiology*, 182: 311 - 322, 2000.
63. Sherr, C. D - type cyclins. Elsevier Science Ltd, 20 (5): 187 - 190, 1995.
64. Summerbell, D., Lewis, J.H., y Wolpert, L. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244, 492 - 496, 1973.
65. Suzuki, D., Yamada, A., Amano, T., Yasuhara, R., Kimura, A., Sakahara, M., Tsumaki, M., Takeda, S., Tamura, M., Nakamura, M., Wada, N., Nohno, T., Shiroishi, T., Aiba, A., y Kamijo, R. Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in interdigital programmed cell death during limb development. *Developmental Biology*, 335: 396 - 406, 2009.
66. Tabin, C. y Wolpert, L. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes and Development*, 21: 1433 - 1442, 2007.
67. Takahashi, M. Theoretical basis for cell cycle analysis. I. Labeled mitosis wave method. *Journal of Theoretical Biology*, 13: 202 - 211, 1966.
68. Takahashi, T., Nowakowski, R., y Caviness V. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neurocortical proliferative zone of the fetal mouse. *The Journal of Neuroscience*, 13 (2): 820 - 833, 1993.
69. Takahashi, T., Nowakowski, R., y Caviness V. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *The Journal of Neuroscience*, 15 (9): 6046 - 6057, 1995.
70. Ten Berge, D., Brugman, S.A., Helms, J.A., y Nusse, R. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell specification during limb development. *Development* 135: 3247 - 3257, 2008-
71. Teta, M., Rankin, M., Long, S., Stein, G., y Kushner, J. Growth and regeneration of adult cells does not involve specialized progenitors. *Developmental Cell*, 12: 817 - 826, 2007.
72. Towers, M., Mahood, R., Yin, Y., y Tickle, C. Integration of growth and specification in chick wing digit patterning. *Nature*, 452: 882 - 886, 2008.
73. Van Bokhoven, H., Celli, J., van Reeuwijk, J., Rinne, T., Gludemans, B., van Beusekom, E., Rieu, P., Newbury-Ecob, R., Chiang, C., y Brunner, H. MYCN haploinsufficiency is associated with reduced brain size and intestinal atresias in Feingold syndrome. *Nature Genetics* 37(5): 465 - 467, 2005
74. Vega, C., Peterson, D. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nature Methods*, 2 (3): 167 - 169, 2005.
75. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D., y Berneman, Z. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36: 131 - 149, 2003.
76. Voitenleitner, C., Fanning, E., y Nasheuer H. Phosphorylation of DNA polymerase alpha - primase by cyclin A dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogen*, 14: 1611, 1997.
77. Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E., y Harland, R.M. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature*, 405: 81 - 85,

2000.

78. Wanek, N., Muneoka, K., Holler - Dinsmore, G., Burton, R., Bryant, S. A staging system for mouse limb development. *Journal of Experimental Zoology*, 249: 41 - 49, 1989.
79. Welten, M., Pavlovska, G., Chen, Y., Teruoka, Y., Fisher, M., Bangs, F., Towers, M., y Tickle, C. 3D expression patterns of cell cycle genes in the developing chick wing and comparison with expression patterns of genes implicated in digit specification. *Developmental Dynamics*, 240: 1278 – 1288, 2011.
80. Wyngaarden, L.A., Vogeli, K.M., Ciruna, B.G., Wells, M., Hadjantonakis, A.K., y Hopyan, S. Oriented cell motility and division underlie early limb bud morphogenesis. *Development*, 137: 2551 - 2558, 2010.
81. Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, I., Vagner, I., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., y Caput, D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404: 99 -103 (2000).
82. Zaks, T., Chappel, B., Rosenberg, S., Restifo, N. Fas - Mediated suicide of tumor - reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *Journal of Immunology*, 162: 3273 - 3279, 1999.
83. Zeller, R., López-Ríos, J., y Zuñiga, A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Genetics*, 10: 845 - 858, 2009.
84. Zhao, J., Kennedy, B., Lawrence B., Barbie, D., Matera, A., Fletcher J., y Harlow, E. NPAT links cyclin E/cdk2 to the regulation of replication - dependent histones genes transcription. *Genes Development*, 14: 2283, 2000.
85. Zhao, X., Ovidiu, I., Mic, F., Molotkova, N., Molotkov, A., Kumar, S., y Duyster, G. Retinoic acid promotes limb induction through effects in body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Current Biology*, 19: 1050 - 1057, 2009.

## Apéndices

**Tabla 3. Doble marcaje con análogos de la timidina: Metodología reportada**

Tipo	Exp	Muestra	IdU	P	PT	S	Dobles	P	PT	S	Tc (hrs)	Ts (hrs)	P Ts	S Ts	P Tc	S Tc
FL	A	1	111	111.00	106.22	3.35	86	75.67	81.89	3.53	12.61	1.16	1.21	0.0645	12.13	0.5886
		2	109				71									
		3	113				70									
	B	1	105	109.67			81	80.67			11.28	1.11				
		2	108				75									
		3	116				86									
	C	1	104	103.67			88	81.33			12.85	1.27				
		2	100				71									
		3	107				85									
	D	1	109	105.00			89	84.67			12.33	1.27				
		2	102				82									
		3	104				83									
	E	1	117	105.33			85	85.00			11.69	1.21				



	140			129			66			63			0.52			6.52		
	137			115			81			34			1.19			12.07		
30-90A	136	133.78	6.80	124	134.22	11.24	69	67.78	4.74	55	66.44	13.63	0.63	0.54	0.15	7.46	6.43	1.42
	129			133			64			69			0.46			5.95		
	122			148			68			80			0.43			5.13		
30-90B	136	133.78	6.80	126	134.22	11.24	66	67.78	4.74	60	66.44	13.63	0.55	0.54	0.15	6.84	6.43	1.42
	130			121			72			49			0.73			8.38		
	144			123			75			48			0.78			8.55		
30-90C	140	133.78	6.80	149	134.22	11.24	71	67.78	4.74	78	66.44	13.63	0.46	0.54	0.15	5.26	6.43	1.42
	129			144			66			78			0.42			5.26		
	138			140			59			81			0.36			5.07		
30-120A	143	136.89	10.52	145	135.56	9.17	70	71.56	2.19	75	64.00	9.51	0.47	0.57	0.09	5.47	6.54	0.97
	120			132			72			60			0.60			6.84		
	139			133			76			57			0.67			7.20		
30-120B	126	136.89	10.52	123	135.56	9.17	73	71.56	2.19	50	64.00	9.51	0.73	0.57	0.09	8.21	6.54	0.97
	138			127			69			58			0.59			7.08		
	149			136			70			66			0.53			6.22		
30-120C	152	136.89	10.52	129	135.56	9.17	70	71.56	2.19	59	64.00	9.51	0.59	0.57	0.09	6.96	6.54	0.97
	136			146			73			73			0.50			5.62		
	129			149			71			78			0.46			5.26		
30-150A	136	135.67	7.55	131	138.00	8.17	73	71.11	3.18	58	66.89	8.89	0.63	0.54	0.08	7.08	6.23	0.76
	133			131			73			58			0.63			7.08		
	138			139			70			69			0.51			5.95		
30-150B	129	135.67	7.55	127	138.00	8.17	68	71.11	3.18	59	66.89	8.89	0.58	0.54	0.08	6.96	6.23	0.76
	140			138			70			68			0.51			6.04		
	153			135			72			63			0.57			6.52		
30-150C	131	135.67	7.55	141	138.00	8.17	71	71.11	3.18	70	66.89	8.89	0.51	0.54	0.08	5.86	6.23	0.76
	129			152			66			86			0.38			4.77		
	132			148			77			71			0.54			5.78		
30-180A	132	127.67	34.80	135	141.22	6.78	65	67.78	3.11	70	73.44	8.34	0.46	0.47	0.07	5.86	5.65	0.62
	152			147			69			78			0.44			5.26		
	146			136			70			66			0.53			6.22		
30-180B	131	127.67	34.80	153	141.22	6.78	64	67.78	3.11	89	73.44	8.34	0.36	0.47	0.07	4.61	5.65	0.62
	144			148			66			82			0.40			5.01		
	147			139			67			72			0.47			5.70		
30-180C	38	127.67	34.80	138	141.22	6.78	65	67.78	3.11	73	73.44	8.34	0.45	0.47	0.07	5.62	5.65	0.62
	134			133			71			62			0.57			6.62		
	125			142			73			69			0.53			5.95		
30-210A	139	139.56	8.72	152	148.67	4.74	69	66.22	3.03	83	82.44	6.73	0.42	0.41	0.05	4.95	5.01	0.42
	128			152			62			90			0.34			4.56		
	146			144			66			78			0.42			5.26		
30-210B	149	139.56	8.72	154	148.67	4.74	62	66.22	3.03	92	82.44	6.73	0.34	0.41	0.05	4.46	5.01	0.42
	132			153			68			85			0.40			4.83		
	153			147			64			83			0.39			4.95		
30-210C	135			144			70			74			0.47			5.55		





	149			146			77			72			0.53			5.70		
	131			149			71			60			0.59			6.84		
30-150A	148	139.67	7.84	131	137.89	8.34	72	74.44	5.88	76	65.22	10.96	0.47	0.59	0.14	5.40	6.45	1.08
	148			131			78			70			0.56			5.86		
	137			139			65			72			0.45			5.70		
30-150B	136	139.67	7.84	126	137.89	8.34	83	74.44	5.88	53	65.22	10.96	0.78	0.59	0.14	7.75	6.45	1.08
	131			138			79			52			0.76			7.89		
	129			135			75			54			0.69			7.60		
30-150C	151	139.67	7.84	141	137.89	8.34	68	74.44	5.88	83	65.22	10.96	0.41	0.59	0.14	4.95	6.45	1.08
	136			152			71			65			0.55			6.32		
	141			148			79			62			0.64			6.62		
30-180A	130	141.00	11.84	134	130.11	35.21	65	68.67	4.42	65	72.33	11.93	0.50	0.49	0.11	6.32	5.82	1.04
	148			147			69			79			0.44			5.20		
	162			136			73			89			0.41			4.61		
30-180B	133	141.00	11.84	153	130.11	35.21	62	68.67	4.42	71	72.33	11.93	0.44	0.49	0.11	5.78	5.82	1.04
	128			148			77			51			0.75			8.05		
	135			139			68			67			0.51			6.13		
30-180C	156	141.00	11.84	38	130.11	35.21	68	68.67	4.42	88	72.33	11.93	0.39	0.49	0.11	4.66	5.82	1.04
	140			133			66			74			0.45			5.55		
	137			143			70			67			0.52			6.13		
30-210A	140	141.78	8.48	152	148.67	4.74	77	69.56	3.28	63	72.22	9.46	0.61	0.49	0.08	6.52	5.77	0.77
	143			152			67			76			0.44			5.40		
	146			144			68			78			0.44			5.26		
30-210B	152	141.78	8.48	154	148.67	4.74	70	69.56	3.28	82	72.22	9.46	0.43	0.49	0.08	5.01	5.77	0.77
	126			153			67			59			0.57			6.96		
	139			147			70			69			0.51			5.95		
30-210C	145	141.78	8.48	144	148.67	4.74	70	69.56	3.28	75	72.22	9.46	0.47	0.49	0.08	5.47	5.77	0.77
	133			141			71			62			0.57			6.62		
	152			151			66			86			0.38			4.77		
30-240A	140	142.67	7.92	155	148.11	6.37	65	65.44	2.79	75	77.22	8.81	0.43	0.43	0.06	5.47	5.38	0.63
	151			147			66			85			0.39			4.83		
	148			153			69			79			0.44			5.20		
30-240B	136	142.67	7.92	150	148.11	6.37	63	65.44	2.79	73	77.22	8.81	0.43	0.43	0.06	5.62	5.38	0.63
	155			154			64			91			0.35			4.51		
	131			140			66			65			0.51			6.32		
30-240C	143	142.67	7.92	145	148.11	6.37	65	65.44	2.79	78	77.22	8.81	0.42	0.43	0.06	5.26	5.38	0.63
	145			152			61			84			0.36			4.89		
	135			137			70			65			0.54			6.32		

**Exp:** experimento; **IdU:** Células con la marca de IdU; **CIdU:** Células con la marca de CIdU; **30 – 30A:** Extremidades incubadas 30 minutos con el primer análogo, y 30 minutos con el segundo, del experimento A; **P:** promedio; **Pt:** promedio total; **S:** desviación estándar; **St:** desviación estándar del promedio total; **Tc:** duración total del ciclo celular; **Ts:** duración de la fase S; **Sc:** número de células dobles marcadas; **Lc:** fracción saliente; **I/C:** IdU como primer análogo administrado; **C/I:** CIdU como primer análogo administrado.

<b>T (h)</b>	<b>T total (h)</b>	<b>Lc (C/I)</b>	<b>Lc (I/C)</b>	<b>Lc (P)</b>
0.5	1.5	49.11	61.59	55.35
1.0	2.0	57.67	59.22	58.45
1.5	2.5	66.44	61.44	63.94
2.0	3.0	64.00	62.11	63.06
2.5	3.5	66.89	65.22	66.06
3.0	4.0	73.44	72.33	72.89
3.5	4.5	82.44	72.22	77.33
4.0	5.0	82.33	77.22	79.78

**T:** tiempo; **P:** promedio; **Lc:** fracción saliente; **I/C:** IdU como primer análogo administrado; **C/I:** CIdU como primer análogo administrado.

	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Muestra</b>	<b># marcadas</b>	<b>Promedio</b>	<b>S</b>	<b>Li</b>	<b>S Li</b>
<b>FL</b>	0.5	1	122	122.33	5.51	0.1490	0.0067
		2	117				
		3	128				
	2	1	130	137.33	7.51	0.1673	0.0091
		2	137				
		3	145				
	4	1	198	193.00	4.58	0.2351	0.0056
		2	189				
		3	192				
	6	1	241	239.00	6.24	0.2911	0.0076
		2	232				
		3	244				
8	1	263	262.67	2.52	0.3199	0.0031	
	2	265					
	3	260					
10	1	268	261.33	7.02	0.3183	0.0086	
	2	262					
	3	254					
<b>HL</b>	0.5	1	123	127.00	3.61	0.1547	0.0044
		2	130				
		3	128				
	2	1	161	156.00	10.44	0.1900	0.0127
		2	163				
		3	144				
4	1	203	197.00	6.56	0.2400	0.008	
	2	190					

		3	198				
	6	1	226	234.00	7.55	0.2850	0.0092
		2	235				
		3	241				
	8	1	271	269.00	2.00	0.3276	0.0024
		2	269				
		3	267				
	10	1	263	261.33	4.73	0.3183	0.0058
		2	265				
		3	256				

**FL:** Extremidades superiores (por sus siglas en Inglés: *Forelimbs*); **HL:** Extremidades inferiores (por sus siglas en Inglés: *Hindlimbs*); **S:** desviación estándar; **LI:** relación entre el número de células marcadas con BrdU, y el total de núcleos; **# Marcadas:** número de células con la marca de BrdU.

Tiempo (h)	Exp	Muestra	# mitosis	MM	PMM	P	S	P total	S
1	B1A	1	8	2	25.00	16.67	7.22	21.49	6.57
		2	8	1	12.50				
		3	8	1	12.50				
	B1B	1	7	1	14.29	18.84	4.09		
		2	9	2	22.22				
		3	15	3	20.00				
	B1C	1	9	3	33.33	28.97	4.18		
		2	8	2	25.00				
		3	7	2	28.57				
2	B2A	1	7	1	14.29	25.60	11.62	30.93	4.64
		2	8	3	37.50				
		3	8	2	25.00				
	B2B	1	7	3	42.86	33.17	8.55		
		2	10	3	30.00				
		3	15	4	26.67				
	B2C	1	12	4	33.33	34.03	9.39		
		2	8	3.5	43.75				
		3	8	2	25.00				
3	B3A	1	13	5	38.46	38.83	2.67	44.39	6.46
		2	11	4	36.36				
		3	12	5	41.67				
	B3B	1	9	4	44.44	51.48	7.88		
		2	10	5	50.00				
		3	10	6	60.00				
	B3C	1	7	3	42.86	42.86	0.00		
		2	7	3	42.86				

		3	7	3	42.86				
4	B4A	1	15	6	40.00	44.81	5.01	48.97	4.28
		2	8	4	50.00				
		3	9	4	44.44				
	B4B	1	9	5	55.56	53.37	2.96		
		2	11	6	54.55				
		3	10	5	50.00				
	B4C	1	8	5	62.50	48.72	12.70		
		2	8	3	37.50				
		3	13	6	46.15				
5	B5A	1	9	4	44.44	49.12	6.27	48.68	0.47
		2	15	7	46.67				
		3	16	9	56.25				
	B5B	1	12	5	41.67	48.74	6.53		
		2	11	6	54.55				
		3	14	7	50.00				
	B5C	1	12	6	50.00	48.18	7.44		
		2	11	6	54.55				
		3	10	4	40.00				
6	B6A	1	15	6	40.00	42.37	2.80	48.80	6.31
		2	11	5	45.45				
		3	12	5	41.67				
	B6B	1	7	4	57.14	49.05	8.61		
		2	10	5	50.00				
		3	10	4	40.00				
	B6C	1	6	4	66.67	54.99	11.15		
		2	13	7	53.85				
		3	9	4	44.44				
7	B7A	1	12	5	41.67	45.74	8.54	46.53	1.02
		2	10	4	40.00				
		3	9	5	55.56				
	B7B	1	13	5	38.46	46.15	8.67		
		2	9	4	44.44				
		3	9	5	55.56				
	B7C	1	8	4	50.00	47.69	9.25		
		2	9	5	55.56				
		3	8	3	37.50				
8	B8A	1	10	4	40.00	44.29	5.15	48.37	3.67
		2	7	3	42.86				
		3	8	4	50.00				
	B8B	1	12	6	50.00	51.39	10.49		

		2	12	5	41.67						
		3	8	5	62.50						
	B8C	1	12	7	58.33	49.44	9.18				
		2	10	4	40.00						
		3	6	3	50.00						
9	B9A	1	9	3	33.33	36.52	7.84				
		2	11	5	45.45						
		3	13	4	30.77						
	B9B	1	8	4	50.00	47.62	4.12	43.99	6.47		
		2	8	4	50.00						
		3	7	3	42.86						
	B9C	1	7	4	57.14	47.84	10.56				
		2	11	4	36.36						
		3	10	5	50.00						
10	B10A	1	12	3	25.00	38.64	11.81				
		2	11	5	45.45						
		3	11	5	45.45						
	B10B	1	6	1	16.67	23.33	8.82	31.46	7.70		
		2	10	2	20.00						
		3	6	2	33.33						
	B10C	1	8	3	37.50	32.41	8.82				
		2	8	3	37.50						
		3	9	2	22.22						
11	B11A	1	13	3	23.08	25.12	2.10				
		2	11	3	27.27						
		3	8	2	25.00						
	B11B	1	8	2	25.00	23.41	6.11	24.57	1.00		
		2	6	1	16.67						
		3	7	2	28.57						
	B11C	1	9	2	22.22	25.19	7.14				
		2	5	1	20.00						
		3	12	4	33.33						
12	B12A	1	4	1	25.00	19.44	17.35				
		2	6	2	33.33						
		3	3	0	0.00						
	B12B	1	5	1	20.00	27.30	6.76	23.76	3.98		
		2	6	2	33.33						
		3	7	2	28.57						
	B12C	1	5	1	20.00	24.52	4.31				
		2	8	2	25.00						
		3	7	2	28.57						

13	B13A	1	8	3	37.50	31.94	6.36	23.98	6.90
		2	8	2	25.00				
		3	9	3	33.33				
	B13B	1	5	1	20.00	20.00	0.00		
		2	5	1	20.00				
		3	5	1	20.00				
	B13C	1	5	1	20.00	20.00	0.00		
		2	5	1	20.00				
		3	5	1	20.00				
14	B14A	1	10	3	30.00	29.05	0.82	26.72	3.00
		2	7	2	28.57				
		3	7	2	28.57				
	B14B	1	3	1	33.33	27.78	4.81		
		2	4	1	25.00				
		3	4	1	25.00				
	B14C	1	5	1	20.00	23.33	8.82		
		2	6	2	33.33				
		3	6	1	16.67				
15	B15A	1	4	1	25.00	30.56	4.81	28.79	1.53
		2	6	2	33.33				
		3	9	3	33.33				
	B15B	1	3	1	33.33	28.04	5.57		
		2	7	2	28.57				
		3	9	2	22.22				
	B15C	1	8	2	25.00	27.78	4.81		
		2	6	2	33.33				
		3	4	1	25.00				
16	B16A	1	7	2	28.57	31.55	5.15	30.73	2.64
		2	7	2	28.57				
		3	8	3	37.50				
	B16B	1	5	2	40.00	32.86	6.23		
		2	7	2	28.57				
		3	10	3	30.00				
	B16C	1	5	1	20.00	27.78	6.94		
		2	6	2	33.33				
		3	10	3	30.00				
17	B17A	1	6	2	33.33	34.60	10.29	32.52	1.86
		2	12	3	25.00				
		3	11	5	45.45				
	B17B	1	5	1	20.00	31.01	12.40		
		2	9	4	44.44				

		3	7	2	28.57				
	B17C	1	8	3	37.50	31.94	6.36		
		2	4	1	25.00				
		3	9	3	33.33				
		3	9	3	33.33				
18	B18A	1	6	1	16.67	27.78	9.62	28.43	3.05
		2	6	2	33.33				
		3	9	3	33.33				
	B18B	1	7	2	28.57	31.75	2.75		
		2	9	3	33.33				
		3	6	2	33.33				
	B18C	1	6	2	33.33	25.76	8.44		
		2	6	1	16.67				
		3	11	3	27.27				
	19	B19A	1	10	3	30.00	27.66		
2			9	2	22.22				
3			13	4	30.77				
B19B		1	5	2	40.00	33.33	11.55		
		2	5	1	20.00				
		3	5	2	40.00				
B19C		1	7	2	28.57	25.40	9.91		
		2	6	2	33.33				
		3	7	1	14.29				
20	B20A	1	5	1	20.00	27.50	9.01	26.97	2.31
		2	4	1	25.00				
		3	8	3	37.50				
	B20B	1	4	1	25.00	28.97	4.18		
		2	6	2	33.33				
		3	7	2	28.57				
	B20C	1	5	1	20.00	24.44	7.70		
		2	5	1	20.00				
		3	6	2	33.33				
21	B21A	1	10	4	40.00	33.97	5.74	31.76	4.32
		2	9	3	33.33				
		3	7	2	28.57				
	B21B	1	7	2	28.57	34.52	5.15		
		2	8	3	37.50				
		3	8	3	37.50				
	B21C	1	10	3	30.00	26.78	3.49		
		2	13	3	23.08				
		3	11	3	27.27				
22	B22A	1	11	3	27.27	28.61	1.36	29.69	2.02



		2	10	3	30.00						
		3	7	2	28.57						
	B22B	1	7	2	28.57	32.02	4.80				
		2	8	3	37.50						
		3	10	3	30.00						
	B22C	1	11	3	27.27	28.44	2.02				
		2	13	4	30.77						
		3	11	3	27.27						
23	B23A	1	7	2	28.57	29.78	1.12				
		2	10	3	30.00						
		3	13	4	30.77						
	B23B	1	13	4	30.77	30.89	2.38	29.34	1.81		
		2	14	4	28.57						
		3	9	3	33.33						
	B23C	1	14	3	21.43	27.34	5.95				
		2	12	4	33.33						
		3	11	3	27.27						
24	B24A	1	8	2	25.00	29.44	4.19				
		2	6	2	33.33						
		3	10	3	30.00						
	B24B	1	9	3	33.33	35.93	7.56				
		2	10	3	30.00						
		3	9	4	44.44						
	B24C	1	7	3	42.86	37.90	4.77				
		2	9	3	33.33						
		3	8	3	37.50						

**Exp:** experimento; **Muestra:** Número de muestra dentro del experimento; **#mitosis:** número de mitosis detectadas en los 100µm distales de la extremidad; **MM:** mitosis marcadas; **PMM:** porcentaje de mitosis marcadas; **P:** promedio; **S:** desviación estándar.