



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de medicina

Instituto de investigaciones biomédicas

La actividad del RAR γ es responsable de proximalizar la información posicional del blastema regenerante de la extremidad en *Ambystoma mexicanum*

TESIS

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Presenta:

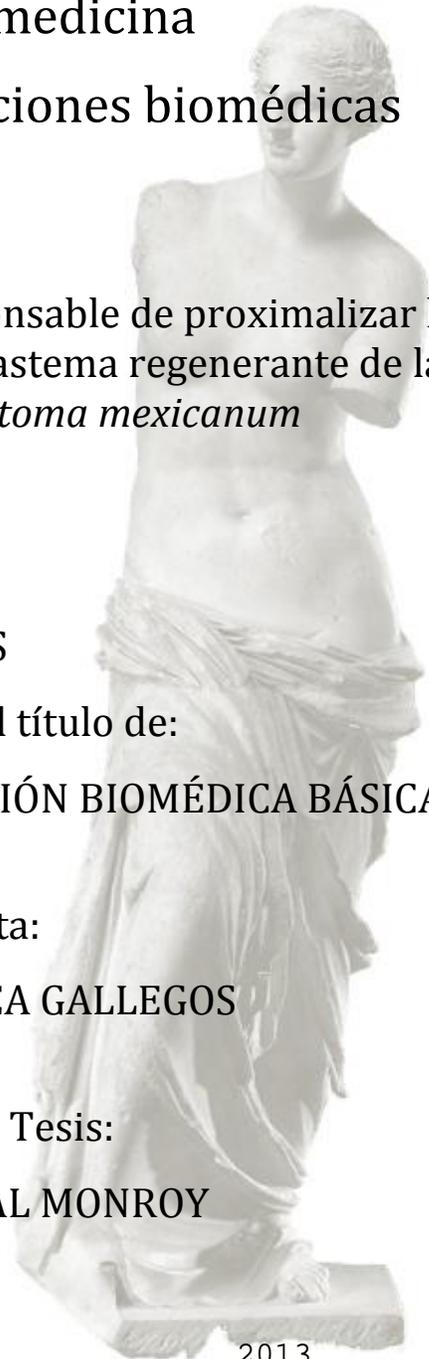
DONOVAN CORREA GALLEGOS

Director de Tesis:

Dr. JESÚS CHIMAL MONROY

México DF

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



“I would give my right arm to discover the secret of regeneration”

-Oscar E. Schotté

“The oldest and strongest emotion of mankind is fear, and the oldest and strongest kind of fear is fear of the unknown.”

-H. P. Lovecraft

Agradezco:

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional, que me han permitido llegar a este momento.

A mi hermana y su familia por enseñarme la importancia de perseguir siempre mis sueños y anhelos.

A todas las personas que se han integrado en alguna parte de mi vida y, de manera directa o indirecta, afectaron mi camino para llegar a lo que soy ahora y que llamo con gusto amigos.

Al Dr. Jesús Chimal Monroy por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por sus enseñanzas, apoyo y permitirme una gran libertad para desarrollar este trabajo.

El apoyo técnico invaluable de la M. en C. Marcia Bustamante.

A los integrantes del laboratorio: March, Marta, Sabina, Silvina, Karen, Valentina, Dante, Ale, Claudio, Jess, Lalo, Bruno, Faviel, Beto, Cristobal y muchos más, por hacer del ambiente de trabajo en el laboratorio tan divertido y enriquecedor.

A los revisores: Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dr. Fernando López Casillas, Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza y a la Dra. Rosa Estela Navarro González; por sus valiosos consejos, sugerencias y observaciones.

Por último al lector que sostiene y da vida a este escrito.

Abreviaturas

ADAM – Proteínas desintegrinas y metaloproteinasas
ADH - Alcohol deshidrogenasa
AER – Cresta ectodermal apical
AGP – proteína de gradiente anterior
AKR - Aldo-ceto reductasa
BCO - Beta, -beta-caroteno-15-15' monooxigenasa
CRABP - Proteína celular de unión ácido retinoico
CRBP - Proteína celular de unión a retinol
CTGF – Factor de crecimiento de tejido conjuntivo
dlx - Distal-less homeobox
FGF – Factor de crecimiento fibroblástico
GGF – Factor de crecimiento glial
HOX – homeobox
IGF – Factor de crecimiento de insulínico
KGF – Factor de crecimiento keratinocítico
Klf – Factor tipo Kruppel
Imx - LIM homeobox
LRAT - Lecitina-retinol aciltransferasa
MEIS – Sitio de integración viral ecotrópico mieloide
MMP – Metaloproteinasas de matriz
Prod – Proteína proximal distal
RA – Ácido retinoico
RALDH - Retinaldehido deshidrogenasa
RARs – Receptores de ácido retinoico
Rb – Retinoblastoma
RBP - Proteína de unión a retinol
RDH - Retinol deshidrogenasa
REH - Hidrolasa de ésteres de retinil
RXRs – Receptores de retinoide X
SHH – Sonic hedgehog
SOX - Sex determining region Y box
STRA - Gen estimulado por ácido retinoico
TGF-beta – Factor de crecimiento transformante beta
TIMP – Inhibidor tisular de metaloproteinasas
Wnt – Proteínas tipo Wingless
ZPA – Zona de actividad polarizante

Contenido

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Establecimiento de patrones y la teoría de la información posicional.....	7
El campo morfogenético	8
La teoría de la información posicional	8
Campos secundarios: desarrollo y regeneración de la extremidad.....	10
Campo de la extremidad y sus organizadores.....	10
Regeneración de la extremidad en anfibios.....	12
La vía de señalización de RA en el establecimiento de patrones.....	18
RA en el desarrollo y regeneración de la extremidad	18
RARs, efectores funcionales del RA.....	21
Planteamiento del problema	23
Objetivos	24
General.....	24
Particulares.....	24
RESULTADOS	24
La activación farmacológica de los RARalfa y gama retrasan la regeneración y producen dPD o inhiben la regeneración de manera similar	25
Am580 induce la formación de la membrana basal e incrementa la expresión de <i>mmp9</i>	30
La activación del RARgama es responsable de las dPD.....	33
Los RXRs podrían modular la actividad de los RARs.....	36
La activación de los RARs produce duplicaciones especulares.....	39
DISCUSIÓN.....	41
RA en la regeneración e identidad posicional.....	41
La señalización de RA no es necesaria durante los primeros estadios de la regeneración	41
RA no re-especifica los valores posicionales del eje próximo-distal en condiciones normales	42
Posible función de RA regulando la remodelación de la membrana basal.....	44
Funciones específicas de los RARs:	45
RARgama durante la regeneración de la extremidad	46
RXRs como moduladores de los RARs.....	48
Modelo teórico para el establecimiento de patrones explica los fenotipos por RA.....	49

Modelos de límites y coordenadas polares.....	49
dPD en el modelo de coordenadas polares	53
El modelo de coordenadas polares clásico no explica la preferencia a amputaciones proximales de las duplicaciones especulares.....	54
CONCLUSIÓN	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
Fármacos y reactivos.....	62
Cuidado, cirugía y tratamientos	62
Monitoreo de la regeneración	63
Tinción de esqueleto	63
Histología.....	63
Software y estadística	65
APOYOS Y DONACIONES	65
REFERENCIAS.....	66

RESUMEN

La formación de patrones espaciales en los organismos es una pregunta central en la biología del desarrollo. Una explicación generalizable es que las células forman un campo morfogenético el cual es regulado comúnmente por un conjunto de células dentro del mismo, llamados centros organizadores. La interacción del centro con el resto del campo define últimamente los patrones que generará el campo.

La regeneración de la extremidad de los urodelos representa un interesante modelo para estudiar el establecimiento de patrones; la amputación de una extremidad en la salamandra *Ambystoma mexicanum* por un depredador o una tijera de cirugía puede darse a cualquier altura a lo largo del eje próximo-distal (torso a dedos), no obstante solo las estructuras perdidas son regeneradas. Este fenómeno, llamado “regla de la transformación distal”, implica que el campo morfogenético puede autoregularse de tal manera que se asegure de solo regenerar los patrones perdidos. De tal manera que éste es un valioso modelo para estudiar la regulación dentro de un campo morfogenético.

En los últimos años, los esfuerzos se han enfocado en detectar los agentes moleculares que rigen los campos morfogenéticos. En los años 80's se observó que la exposición a grandes concentraciones de retinol (vitamina A) y sus derivados como el ácido retinoico, llamados en conjunto "retinoides", afectaban la regeneración de la extremidad provocando que estructuras más proximales al corte se regeneraran, yendo en contra a la regla de la transformación distal. Esto sugiere que los retinoides pudieran regular el campo morfogenético de la regeneración de la extremidad. Los retinoides, naturales o sintéticos, actúan a través de la activación de los receptores nucleares de ácido retinoico o RARs. Debido a que existen distintos tipos de RARs y a estos se les asocia funciones específicas durante el desarrollo embrionario ¿tienen los distintos RARs diversas funciones durante la regeneración de la extremidad, incluida la regulación del campo morfogenético y la formación de patrones?

El presente trabajo aborda dicha pregunta haciendo uso de fármacos que activen o inhiban de manera específica a dichos receptores durante la regeneración de la extremidad posterior de *A. mexicanum*. Nuestros resultados indican que en particular el receptor gama es un agente importante para la adecuada morfogénesis de los dígitos en condiciones normales de regeneración, así como también es el agente responsable de modificar el campo morfogenético cuando hay un exceso de retinoides. Además, observamos que a concentraciones altas estos fármacos pueden inhibir la regeneración, posiblemente por un desacoplamiento de la remodelación de la membrana basal que ocurre durante las primeras fases de la regeneración. También probamos si la activación o inhibición de los compañeros estructurales de los RARs, los receptores de retinoide X o RXRs, afecta la regeneración; los resultados sugieren que los RXRs pudieran modular la actividad de los RARs. Por último, observamos que en algunos casos no solo se modificaron los patrones en el eje próximo-distal, sino también en el dorso-ventral (dorso-palma) y antero-posterior (pulgar-meñique) lo que sugiere que los RARs pudieran regular los patrones de los tres ejes espaciales del campo.

INTRODUCCIÓN

Establecimiento de patrones y la teoría de la información posicional

Una de las grandes preguntas en la biología es cómo en el desarrollo de un organismo se forman arreglos espaciales tan intrincados y variados a partir de una o un grupo de células aparentemente homogéneas. Es decir, como se establecen los patrones espaciales de un organismo.

El campo morfogenético

Los pioneros en la biología del desarrollo realizaron experimentos manipulando embriones de diversas especies como erizo de mar, ranas y salamandras como el “ajolote” (*Ambystoma mexicanum*); y observaron los efectos que tenían estas manipulaciones en la generación de las estructuras del embrión. De estos experimentos surgió el término de **campos morfogenéticos**¹⁻². Un campo morfogenético se define funcionalmente como un dominio en el que pueden ocurrir cambios en los destinos presuntivos de las células que lo conforman en respuesta a una manipulación o perturbación externa¹. En otras palabras, un campo es un grupo de células que se regulan como un conjunto y que darán lugar a una estructura en particular, durante una perturbación externa como la división de un embrión en dos mitades, la autorregulación del campo permite que las células no perturbadas puedan suplir la función de las células afectadas y regenerar el campo.

La autorregulación de un campo depende comúnmente de un pequeño grupo de células dentro del mismo que actúan como **centros organizadores** que dirigen los destinos del campo. En los anfibios, el organizador de Spemann regula a todo el embrión durante la gastrulación. La trasplante de este organizador, localizado en el labio distal del blastoporo, al sitio ventral de la blástula en otro embrión induce la formación de embriones siameses (Fig. 1A), indicando que el segundo organizador modificó al campo para formar un nuevo embrión³⁻⁴.

La teoría de la información posicional

El cómo se generan los patrones, mediante la formación y autorregulación de un campo, ha sido una de las grandes incógnitas por más de 100 años para los biólogos del desarrollo. La teoría de la **información posicional**, propuesta por Wolpert en 1969 da una explicación generalizable a estas preguntas y ha sido ampliamente aceptada. La teoría asume que las células dentro de un campo adquieren **valores posicionales**, similar a un sistema de coordenadas, y su posición dentro del campo es interpretada para dar lugar a patrones espaciales. Un valor posicional se define como un parámetro celular de la posición dentro de un sistema (un campo) el cual puede ser conservado a largo plazo (memoria). De esta manera un campo se puede definir como un grupo de células que tiene su posición especificada con respecto a regiones limítrofes o las fronteras del campo. La autorregulación del campo se daría entonces por una modificación de los valores posicionales existentes⁵⁻⁸.

El cómo se establecen los valores posicionales ha sido el mayor conflicto de esta teoría. En el modelo original de la “bandera francesa”, los valores posicionales eran especificados mediante un

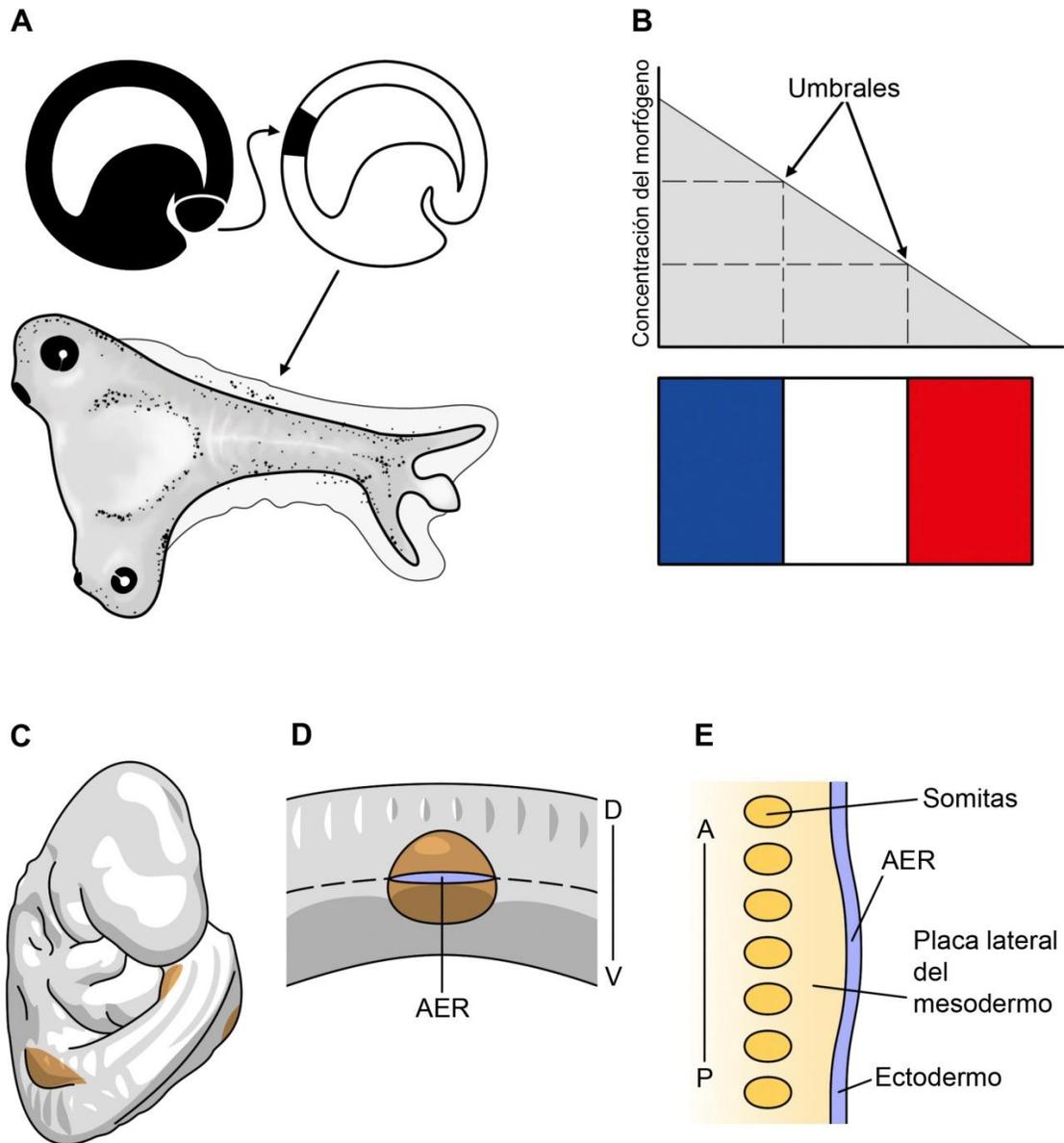


Figura 1. Los campos morfogenéticos y el modelo de la bandera francesa.

A: Organizador de Spemann y Mangold prueba la capacidad reguladora de un grupo de células. El trasplante de una región del labio dorsal del blastoporo del embrión anfibio a otro embrión forma embriones siameses. **B:** Modelo de la bandera francesa de Wolpert explica cómo un gradiente morfogenético puede establecer valores posicionales en un campo, dando una explicación a la formación y regulación de los campos morfogenéticos. **C:** Embrión de ratón en el estadio 9.5, en color se marca los campos de la extremidad. **D:** Representación lateral del embrión, el campo de la extremidad se localiza en los límites de los compartimientos ectodérmicos dorsales y ventrales de los cuales se forma la AER. **E:** Representación de los componentes del campo de la extremidad. AER, cresta ectodérmica apical. A, dorsal. V, ventral. A, anterior. P, posterior. (A partir de referencias 4, 7 y 144).

gradiente de una sustancia que pueda difundir por el campo y modificar a las células en él (Fig. 1B). Esta sustancia, o **morfógeno**, es sintetizada en una de las fronteras y es capaz de difundir hacia el resto del campo, un decaimiento gradual formaría un gradiente en la concentración del morfógeno. Las células interpretarían la señal del morfógeno dependiendo de su concentración, a cierta concentración se llegaría a un umbral en el cual ciertos genes se podrían activar mientras que a bajas concentraciones permanecerían inactivos. De esta manera, dependiendo de la posición de una célula dentro del gradiente morfogenético, se activarían ciertos genes que darían un valor posicional específico⁵⁻⁶. Aunque existe evidencia de varios sistemas que parecen funcionar por la difusión de un morfógeno para establecer la información posicional, hoy en día se reconoce que la simple difusión de un morfógeno debe actuar en conjunto y de manera dinámica con los diversos procesos intra, inter y extracelulares que podrían ocurrir en el campo^{7,9-11}.

Campos secundarios: desarrollo y regeneración de la extremidad

En el desarrollo temprano todo el embrión funciona como un campo, este campo primario establece los patrones generales de todo el embrión en sus ejes espaciales primarios (Fig. 1A); dorso-ventral y antero-posterior (rostral-caudal). Tiempo después, durante el desarrollo surgen nuevos campos que se regulan independientemente del campo primario y se encargan de modelar estructuras más específicas en el embrión, como las extremidades (Fig. 1C).

Campo de la extremidad y sus organizadores

El campo de la extremidad se especifica mucho antes de que siquiera los primordios surjan, éste se compone de la placa lateral del mesodermo y del ectodermo que lo recubre (Fig. 1E). La inducción del campo en el mesodermo depende de una serie de regionalizaciones causadas por la adquisición de valores posicionales a lo largo del eje antero-posterior del embrión, por lo que al momento de la inducción del campo los valores posicionales en éste eje ya se encuentran especificados. El campo de la extremidad se sitúa en la frontera de los compartimientos dorsal y ventral del ectodermo del embrión, por lo que muy posiblemente los valores en el eje dorso-ventral también se encuentran especificados en el campo durante su formación (Fig. 1D). En esta frontera se induce la formación de un importante organizador llamado **cresta ectodérmica apical (AER)**, mediante la comunicación entre las células mesenquimales y del ectodermo donde actúan circuitos reguladores de los morfógenos FGFs (factores de crecimiento de fibroblastos) y Wnts¹². La formación de la AER en el ectodermo desencadena, mediante la comunicación ectodermo-mesénquima, el crecimiento y establecimiento de patrones de las estructuras en el eje próximo-distal de la extremidad; estilópodo, zeugópodo y autópedo (Fig. 2A). El mecanismo exacto que

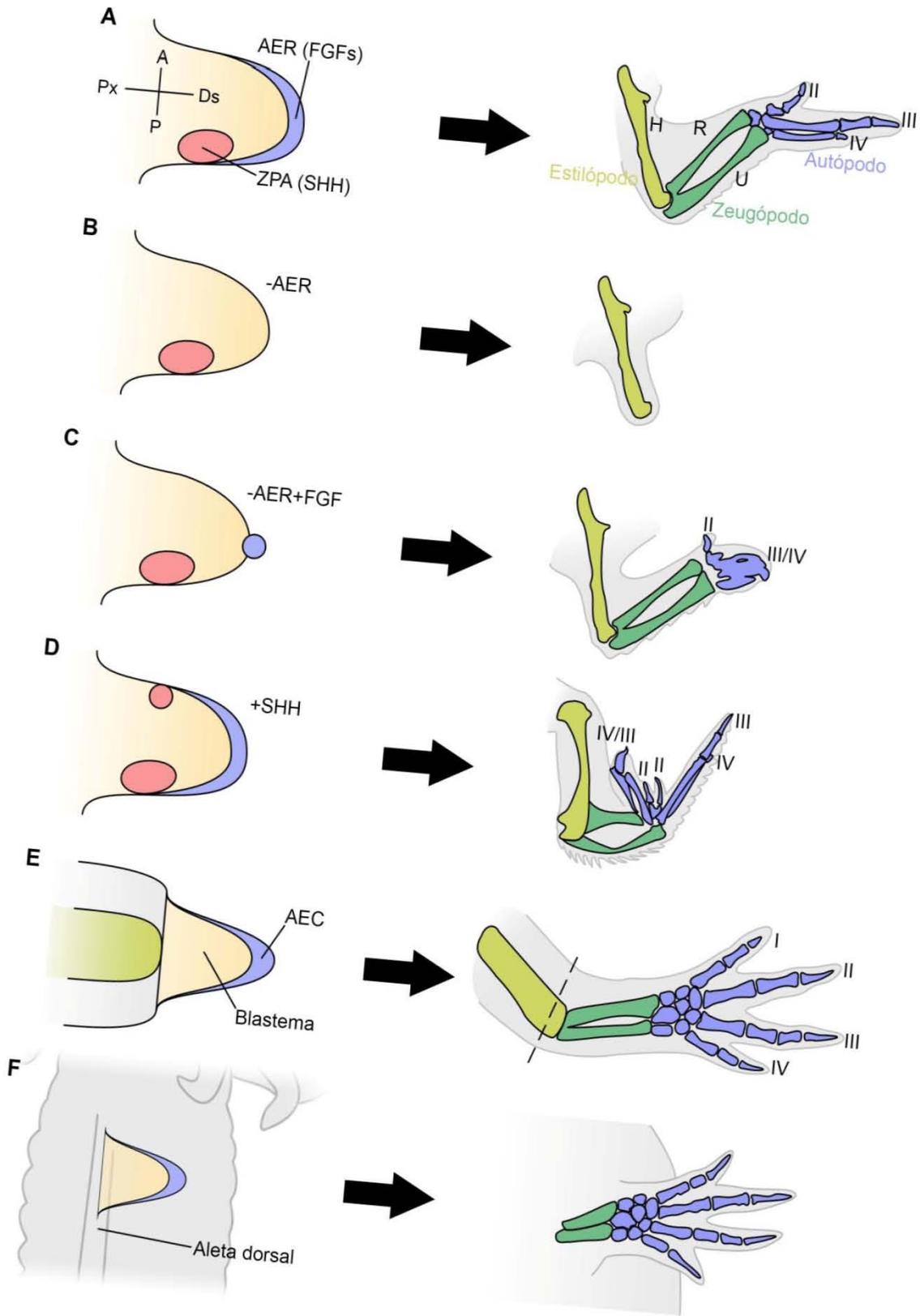


Figura 2. Centros organizadores en el desarrollo y regeneración de la extremidad.

A: La señalización de los organizadores de la cresta ectodérmica apical (AER) con FGFs y la zona con actividad polarizante (ZPA) con SHH moldean al primordio de la extremidad de pollo en los ejes antero-posterior y próximo-distales, para generar todas las estructuras en la extremidad, representadas con el esqueleto. **B:** La remoción quirúrgica de la AER trunca el crecimiento y evita la generación de estructuras distales. **C:** La implantación de perlas embebidas con FGFs puede remplazar a la AER y generar nuevamente estructuras distales. **D:** La expresión ectópica de SHH en el flanco anterior del primordio produce la formación de dígitos supernumerarios con un patrón antero-posterior invertido, sugiriendo la formación de un segundo centro organizador. **E:** En urodelos la amputación de la extremidad lleva a la formación de un blastema que regenera las estructuras perdidas a partir del nivel de corte (línea punteada), la capa epitelial apical (AEC) funge como un organizador análogo al AER. **F:** Un blastema trasplantado en la aleta dorsal forma todas las estructuras distales al sitio de corte de origen, por lo que el blastema se autorregula una vez establecido (A partir de referencias 17, 19 y 26).

establece los patrones aún se desconoce y varios modelos han surgido para explicar este proceso¹³⁻¹⁶; no obstante, todos concuerdan en que la señalización de este organizador radica en la producción de FGFs, ya que la implantación de perlas bañadas en FGFs puede suplir la actividad de la AER cuando ésta es removida quirúrgicamente¹⁷⁻¹⁸ (Fig. 2B-C). Un segundo centro organizador, localizado en el dominio posterior del mesénquima, actúa en conjunto a la AER para promover el crecimiento del primordio de la extremidad y especificar los patrones del eje antero-posterior llamado **zona de actividad polarizante (ZPA)**. Al igual que la AER, la actividad de la ZPA depende de la producción y difusión de un morfógeno llamado sonic hedgehog (SHH), el cual es capaz de inducir la formación de un segundo centro organizador cuando se induce su expresión de manera ectópica en la región anterior del primordio¹⁹ (Fig. 2D). La gran mayoría de los experimentos que llevaron a la identificación y caracterización de estos centros organizadores se realizaron en pollo y ratón, no obstante se ha observado que están evolutivamente conservados¹³.

Regeneración de la extremidad en anfibios

El “Ajolote” (*Ambystoma mexicanum*), al igual que los anfibios del grupo de los urodelos (anfibios que retienen su cola después de la metamorfosis a diferencia de los sapos y ranas que conforman el grupo de los anuros) tienen la capacidad, a lo largo de toda su vida, de regenerar sus extremidades cuando éstas son amputadas. Los anuros, en comparación, solo retienen esta capacidad durante la etapa larvaria y la pierden progresivamente durante la metamorfosis²⁰⁻²¹. La capacidad regenerativa de los urodelos está documentada desde el siglo XVIII en los trabajos de Lazzaro Spallanzani²², pero no fue hasta 1901 que T. H. Morgan describió los dos procesos básicos que rigen la regeneración, “epimorfosis” y “morfalaxis”, sentando así las bases de la biología

regenerativa²³. La regeneración de la extremidad en urodelos se considera epimórfica y ésta se caracteriza por la formación de un “**blastema**” en el sitio de corte del cual crecen y se forman las estructuras perdidas (Fig. 2E). En comparación, la morfalaxis no se basa en el crecimiento *in situ* de alguna estructura sino de la remodelación de las partes restantes para regenerar las estructuras perdidas y ocurre comúnmente en invertebrados. El blastema de la extremidad de urodelos se conforma por una masa de células de apariencia mesenquimática o indiferenciada que se acumula en la parte apical del muñón y es recubierto con un epitelio especializado llamado epitelio de herida (Apéndice 1).

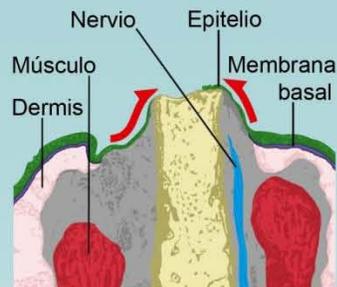
El blastema de la extremidad comparte ciertas características con el primordio de la extremidad por lo que se le puede considerar una estructura análoga²⁴. Una vez formado, el blastema se autorregula de manera independiente al resto de la extremidad por lo que se le puede considerar también como un campo secundario, esto se ha demostrado en experimentos de trasplantes de blastemas a otros tejidos como la aleta dorsal y órbita ocular²⁵⁻²⁷ (Fig. 2F). En el blastema se reconoce únicamente un centro organizador análogo a la AER, llamado **capa epitelial apical (AEC)** o “epitelio regenerante”; éste es un tejido engrosado que se forma en el ápice del blastema y dirige su crecimiento²⁸. Al igual que la AER, la AEC produce FGFs²⁹⁻³¹ y otros factores de crecimiento como la proteína de gradiente anterior AGP³². No se ha encontrado un organizador análogo a la ZPA en el blastema; aunque la expresión de SHH se encuentra delimitada en la zona posterior, de manera similar al primordio de la extremidad. La expresión de SHH ocurre muy tarde en la regeneración (blastema tardío a paleta) y su expresión ectópica en la zona anterior del blastema no replica los fenotipos obtenidos en el desarrollo³³⁻³⁵, por lo que pareciera que su papel pudiera estar relacionado con la determinación del número de dígitos mediante su actividad mitogénica pero no en el establecimiento de patrones en el eje antero-posterior³⁵⁻³⁶. Como ya se mencionó, la actividad de un organizador normalmente depende de la producción y liberación de un morfógeno al campo morfogenético. Esto supone un conflicto en el blastema, ya que usualmente los campos morfogenéticos son lo suficientemente pequeños (menos de 1 mm) como para que la difusión de un morfógeno pudiera tener un impacto en todo el campo⁷, mientras que el diámetro del muñón de un ajolote adulto es mucho más grande (~7mm) por lo que el posible impacto en la actividad de un morfógeno para especificar patrones en el blastema es debatible.

Las similitudes entre la regeneración y el desarrollo de la extremidad observadas durante los últimos años, como la expresión de HOXs, MEIS y demás marcadores moleculares²⁴ (Apéndice 1),

Apéndice 1 Estadios de la regeneración de la extremidad en urodelos

Clásicamente, el proceso de regeneración se divide en fases o estadios morfológicamente distinguibles a simple vista o por histología; aunque diversos procesos y la expresión de marcadores moleculares pueden estar contenidos en distintas fases, mecanismos básicos pueden ser asociados a ciertos estadios^{24, 94}.

Cierre de herida: En respuesta a una amputación, semejante a los mamíferos, la sangre forma un coágulo que funciona como una cobertura temporal que previene la pérdida del fluido intersticial. Entonces los keratinocitos de la epidermis rápidamente comienzan a migrar para cubrir la superficie expuesta y formar el epitelio de herida (~10 h), agentes importantes para este proceso incluyen MMP9, fibronectina/fibrinógeno y KGF. El epitelio de herida, a diferencia de epitelios en tejidos adultos, carece de una membrana basal que separe el epitelio del tejido conjuntivo, la ausencia de la membrana basal permite interacciones vitales para la regeneración entre el epitelio de herida y las células del blastema.



Cierre de herida

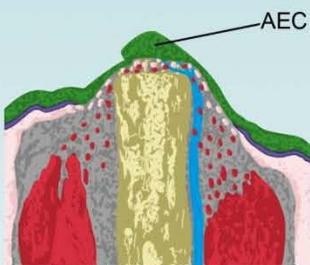
Genes expresados:

Histólisis: fibronectina, mmp3/10-a, mmp3/10-b, mmp9, nCol, timp1 y tgf-beta1.

Proliferación: fgf8 y fgf10.

Marcadores de células indiferenciadas: nanog y piwi-like2.

Patrones: hoxd8, hoxd10, prod1 y fgf8.



Desdiferenciación

Desdiferenciación: Una vez cerrada la herida, el epitelio comienza a proliferar y engrosarse mientras que los nervios sensoriales empiezan a inervarlo; la comunicación de los nervios con el epitelio, mediada en parte por los agentes FGF2, KGF, AGP y Wnt, lleva a la maduración del epitelio de herida a un epitelio secretor que funciona como un organizador para la regeneración llamado la capa epitelial apical (AEC). Es posible que la confrontación de tejido de distintas regiones de la circunferencia de la extremidad, provocada por el cerrado de herida, pueda tener un papel en la maduración de la AEC. La AEC dirige la migración, el crecimiento y el establecimiento de patrones de las células del blastema; en parte por la secreción de factores como FGFs y Wnt5; también produce 9cRA aunque su función se desconoce. Mientras tanto, las células del tejido adyacente a la herida comienzan a liberarse de su organización tisular

mediante la remodelación de la matriz extracelular o histólisis. Células del hueso, músculo, fibroblastos dermales y células de Schwann son liberadas y adquieren un estado semejante a células mesenquimales con linajes restringidos, núcleos grandes, citoplasma escaso y expresan marcadores moleculares como Prrx1. La histólisis es mediada por proteasas extracelulares, como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) e hidrolasas ácidas, estas proteínas también actúan en la remodelación de la membrana basal para asegurar la comunicación entre la AEC y las células del blastema.

Genes expresados:

Histólisis: adam y nmpe.

Marcadores de células indiferenciadas: msx2, pitx1, piwi-like1, tudor3 y tudor7.

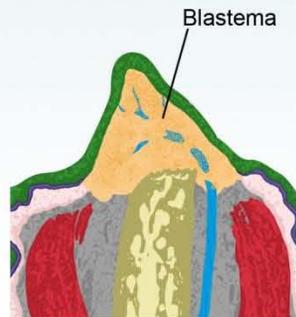
Patrones: dlx3, hoxa9 y hoxa13.

Otros: bhh.

Blastema temprano-medio: El blastema se puede observar a simple vista como un cono aplanado en el blastema temprano, y más simétrico en el blastema medio, que cubre la parte más distal del muñón. Carece de pigmentación e histológicamente se observa que el número de células en él aumenta rápidamente; es de hecho en estos estadios que la proliferación celular incrementa dramáticamente, esta proliferación depende de la señalización conjunta de nervios y de la AEC mediante la secreción de factores de crecimiento como AGP, FGFs, IgF-1, GGF, transferrina y la substancia P. Un paso importante para la iniciación de la mitosis en las células del blastema incluye la fosforilación e inactivación del inhibidor del ciclo celular Rb.

Genes expresados:

Proliferación: bmp2, ctgf, rara y shh.



Blastema medio

Continúa...

Continuación

Marcadores de células indiferenciadas: c-myc.

Patrones: dlx5, fh1, hoxb13, hoxc10, hoxc6, hoxd11, lmx1, wnt7a, meis1 y meis2.

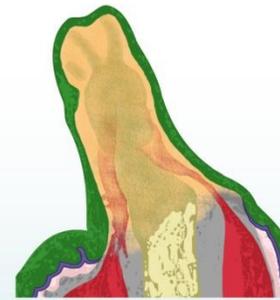
Diferenciación: sox9 y twist.

Otros: rard1.

Blastema tardío, paleta y crecimiento de los dígitos: En el blastema tardío se comienzan a ver ciertas asimetrías en el eje antero-posterior y condensaciones condrocíticas son evidentes en cortes histológicos. Estas características son más evidentes aun en el estadio de paleta cuando la forma del cono se pierde y los dígitos se comienzan a moldear. Posteriormente se observa un surco entre los primeros dedos durante el crecimiento de los dígitos. Su aparición es en secuencia anterior-posterior, opuesta a la de los amniotes que es posterior-anterior; otra diferencia es que los dedos crecen individualmente y no se preforman en conjunto en una placa como en los amniotes. Una vez que se formaron todos los dígitos, la extremidad regenerada es una copia a escala de la extremidad perdida que crecerá hasta alcanzar el tamaño original.

Genes expresados:

Marcadores de células indiferenciadas: klf4 y sox2.



Paleta



Crecimiento de dígitos

llevaron a pensar que la regeneración pudiera representar una recapitulación de los mecanismos que ocurren durante el desarrollo. No obstante, existen importantes diferencias entre estos sistemas que implicarían que adaptaciones a los mecanismos del desarrollo tuvieron que ocurrir durante la evolución para hacer frente a las condiciones en las que ocurre la regeneración. Por ejemplo, la formación de la AER en el desarrollo depende de la comunicación epitelio-mesénquima y de la confrontación de los compartimentos dorsal y ventral cuando se induce el campo de la extremidad; mientras que en la regeneración, la confrontación de compartimentos en los ejes que ocurre durante el cierre de herida (Apéndice 1) y la comunicación del epitelio-mesénquima son insuficientes para promover la regeneración³⁷, la maduración del AEC depende de la participación de los nervios (Apéndice 1) mediante la producción de AGP en las células de Schwann que envuelven al axón durante su reinervación con el epitelio de herida, AGP induce su propia expresión en glándulas dentro del epitelio de herida las cuales lo secretan hacia el mesénquima para promover su crecimiento^{32,38-39}. La necesidad de los nervios para sustentar la regeneración es argumentada como una adaptación evolutiva para asegurar que no se regenere una extremidad si ésta no se encuentra adecuadamente inervada. Otra diferencia entre la AER y la AEC es que la AER incluye únicamente al epitelio mientras que la AEC también incluye las células mesenquimales adyacentes al epitelio²⁹. La naturaleza de las células de las que se componen estos sistemas también es diferente; a diferencia del mesénquima indiferenciado del primordio de la

extremidad, el blastema se forma por la desdiferenciación de músculo y tejido conjuntivo los cuales conservan memoria de su linaje⁴⁰. Anteriormente se creía que la desdiferenciación daba a las células del blastema una multipotencia similar a la del mesenquima del primordio de la extremidad e inclusive marcadores moleculares de pluripotencia se sobreexpresan durante la regeneración⁴¹. Sin embargo, la conservación de una memoria de origen en estas células hace pensar que la desdiferenciación les da un carácter similar a células troncales adultas de linaje restringido. Aun es enigmática la verdadera potencia de las células del blastema pero queda claro que no se trata de una población homogénea. La desdiferenciación podría ser entonces un mecanismo adaptado para obtener células regenerativamente competentes para todos los tejidos y de manera rápida, sin tener que desarrollar y mantener una población de células troncales adultas. Una diferencia más radica en las necesidades de crecimiento que tiene cada sistema. En el desarrollo, el campo siempre da origen a una extremidad completa, mientras que el blastema se puede originar a cualquier nivel a lo largo del eje próximo-distal de la extremidad y éste únicamente da origen a las estructuras distales perdidas. Es decir, un blastema producido por una amputación a nivel del zeugópodo distal da origen únicamente al autópedo, mientras que una amputación a nivel del estilópodo distal da origen al zeugópodo y autópedo. A este fenómeno se le llamó la **regla de la transformación distal** (Fig. 3A-B). Esto implica que el campo secundario que forma el blastema difiere del campo de la extremidad en cuanto a la regulación del establecimiento de patrones en el eje próximo-distal. Esta regulación es esencial para asegurar que se regeneren únicamente las estructuras perdidas y se asegure la formación de una extremidad funcional.

La regla de la transformación distal puede ser entendida con la teoría de la información posicional de Wolpert. Los valores posicionales conservados a largo plazo (memoria) de las células que se desdiferencian cerca del sitio de amputación determinaran el límite proximal del campo morfogénico, recientemente se ha descrito que esta memoria posicional posiblemente se conserva en sólo el tejido conjuntivo y no en el músculo⁴², posteriormente los valores posicionales más distales del campo se deberían re-especificar durante la regeneración. De esta manera se asegura que no se puedan formar estructuras más proximales al sitio de amputación, sin importar cual sea éste. No obstante, el mecanismo que re-especifica los valores posicionales distales perdidos y la naturaleza de estos valores sigue sin ser entendida. Un candidato es Prod1, ésta es una proteína única de urodelos que se encuentra anclada a la membrana celular y se expresa en un gradiente de proximal a distal en la extremidad adulta, además, puede interactuar con el

mitógeno AGP producido en la AEC y promover la proliferación celular^{32, 43-47}. Prod1 es un candidato llamativo como valor posicional puesto que es importante

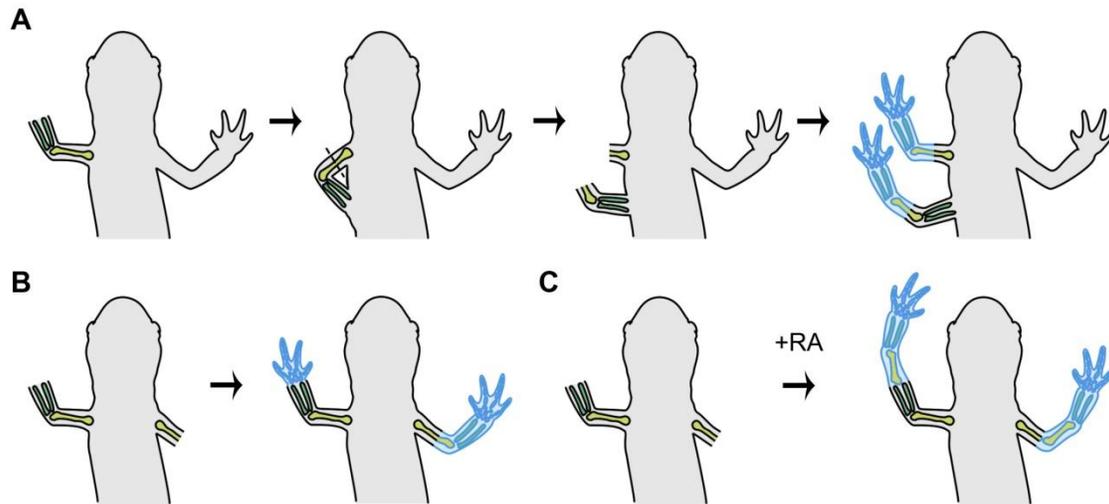


Figura 3. Regla de la transformación distal.

A: experimento de inversión de la orientación de los muñones, probando que únicamente se pueden regenerar estructuras distales al sitio de corte. Un muñón recién amputado al nivel del zeugópodo es unido al costado del animal y se vuelve a amputar a la mitad del estilópodo. Los dos muñones nuevos forman todas las estructuras distales al estilópodo; el muñón de la extremidad invertida no regenera las estructuras proximales que perdió en el corte. **B:** Amputaciones a distintos niveles del eje próximo-distal únicamente regeneran las estructuras distales perdidas. **C:** La exposición a retinoides exógenos, como RA, produce que se formen estructuras proximales al sitio de corte, lo que no ocurre de forma normal (A partir de la referencia 24).

para establecer diferencias en las características celulares a lo largo del eje próximo-distal; esto se demostró en cocultivos de células de blastemas proximales y distales los cuales tienen adhesividades diferentes, las células distales tienen una mayor adhesividad por lo que se concentran y son envueltas por las proximales que tienen una adhesividad menor, pero cuando se bloquea o elimina a Prod1 estas diferencias en adhesividad se pierden^{8,43}.

A finales de los años setenta y principio de los ochenta, una serie de experimentos realizados en la regeneración de la extremidad de anuros y posteriormente repetidos con urodelos mostraron que la regla de la transformación distal podría ser violada⁴⁸. Maden observó que, durante la regeneración de la extremidad en ajolote, la exposición a retinol (vitamina A) y metabolitos derivados como al **ácido retinoico (RA)**, colectivamente llamados retinoides, producían progresivamente la formación de estructuras más proximales al sitio de amputación al

incrementar su concentración o tiempo de exposición⁴⁹⁻⁵¹ (Fig. 3C). Lo que hizo pensar que los retinoides, y en particular el metabolito más potente RA, podrían tener un papel en el establecimiento de patrones del eje próximo-distal durante la regeneración de la extremidad, al regular la especificación de valores proximales de manera dosis dependiente, acorde al modelo de la bandera francesa de Wolpert.

La vía de señalización de RA en el establecimiento de patrones

El retinol (Vitamina A) y su derivado activo RA, son pequeñas moléculas liposolubles que actúan en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos en el organismo adulto al igual que en la embriogénesis de prácticamente todos los tejidos del embrión⁵². Durante el desarrollo, RA regula el establecimiento de patrones en el cerebro, arcos branquiales, corazón, tubo neural y la extremidad; usualmente mediante la formación de un gradiente en su concentración producido por la expresión complementaria de sus enzimas sintetizadoras y degradadoras; fue RA de hecho el primer morfógeno en ser identificado⁵²⁻⁵³ (Apéndice 2).

RA en el desarrollo y regeneración de la extremidad

En el desarrollo de la extremidad, concentraciones apropiadas de RA son necesarias para una adecuada morfogénesis, ya que bajo una deficiencia o un exceso en este morfógeno se producen una gran gama de malformaciones que incluyen desde hipomorfismos y truncaciones hasta la generación de extremidades supernumerarias⁵⁴⁻⁵⁵. Durante el crecimiento de la extremidad se ha propuesto que RA actúa de manera antagónica con la señalización de FGFs de la AER para establecer los patrones en el eje próximo-distal. En el pollo, RA es capaz de regular positivamente la expresión de los marcadores moleculares MEIS1-2 en las zonas presuntivas del estilópodo y negativamente a los marcadores HOXA11 y HOXA13 en el zeugópodo y el autópedo, respectivamente. Mientras que FGF regula negativamente a MEIS1-2 y a la misma señalización de RA⁵⁶. Esto llevó a la formulación del “modelo de las dos señales” (Fig. 4A) el cual implica que el RA sintetizado en la placa lateral del mesodermo difunde hacia el primordio especificando las estructuras proximales (estilópodo) mediante un gradiente, mientras que los FGFs producidos en la AER especifican los dominios más distales (zeugópodo y autópedo) al restringir la señalización de RA¹⁴.

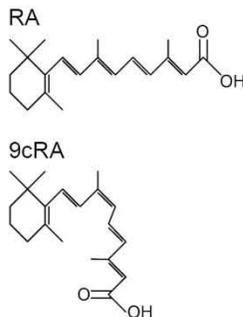
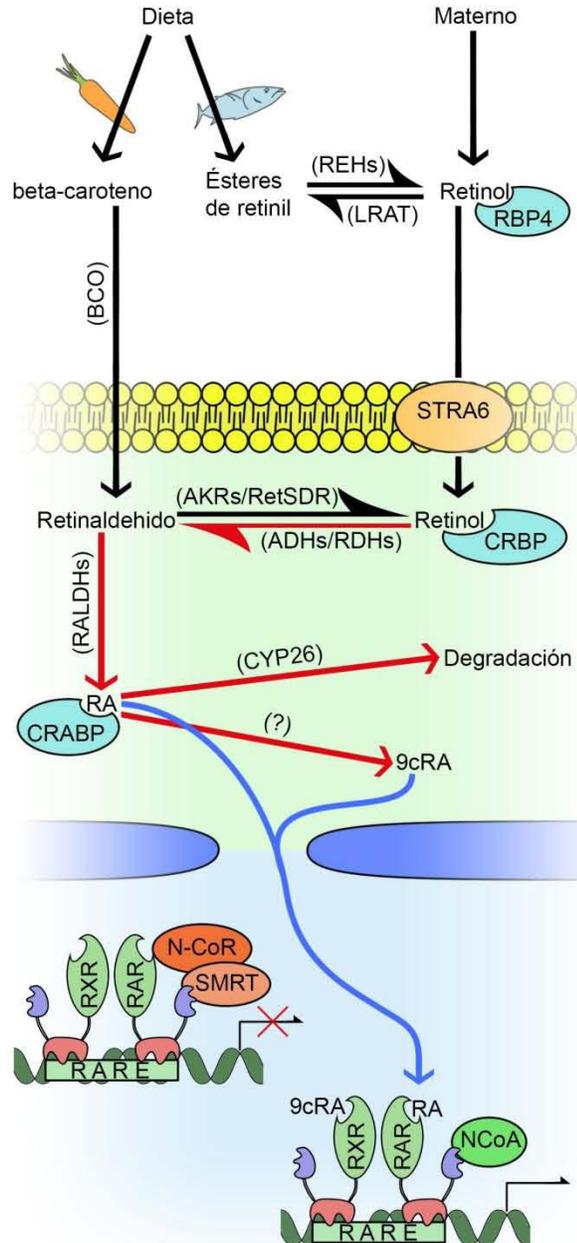
No obstante, el verdadero papel de RA sigue siendo controversial ya que las mutaciones en las enzimas sintetizadoras de RA (Apéndice 2) en ratones no afectan el desarrollo de las extremidades posteriores, pero sí afectan o previenen la formación de los primordios anteriores⁵⁷⁻⁵⁹. La ausencia de los primordios se correlacionó con una extensión en la expresión de FGF8 en el mesodermo

Apéndice 2 Metabolismo y señalización de RA

RA regula la transcripción de diversos genes mediante su unión a los receptores nucleares RARs. Al igual que hormonas que actúan mediante receptores nucleares, su afinidad por estos es muy alta y ejercen su actividad a bajas concentraciones; por lo que la síntesis y degradación de RA debe ser finamente regulada para asegurar concentraciones adecuadas en espacio y tiempo de este morfógeno^{52, 69, 145-147}.

Obtención y almacenamiento celular de retinol: El RA únicamente puede ser sintetizado a partir del retinol (vitamina A). En animales adultos, el retinol sólo se puede obtener de la dieta; mientras que, durante el desarrollo embrionario, el retinol se obtiene por transferencia materna en animales placentados o por reservas contenidas en la yema en especies ovíparas. En animales las reservas de retinol son en forma de ésteres de retinil almacenados en lipocitos hepáticos, por acción de la lecitina-retinil aciltransferasa (LRAT); mientras que en plantas el beta-caroteno es la principal forma de almacenamiento de retinol. Los ésteres de retinil pueden ser re-convertidos en retinol por acción de las hidrolasas de ésteres de retinil (REHs) en el lumen intestinal. El retinol absorbido se une a la proteína de unión de retinol 4 (RBP4) y es transportada por la circulación a los tejidos blanco, una vez ahí, el retinol es trasladado al citoplasma con ayuda de la proteína de membrana STRA6 y se solubilizan en el citoplasma por la unión con las proteínas celulares de unión a retinol (CRBPs). Por otra parte el beta-caroteno, obtenido por la dieta vegetal, es transformado a retinaldehído por la beta,-beta-caroteno-15-15' monooxigenasa (BCO) y este a su vez es reducido a retinol por las aldo-ceto-reductasas (AKRs) y la RetSDR.

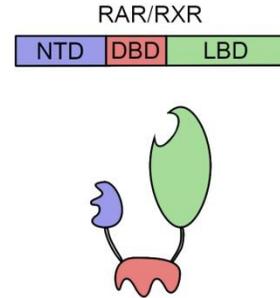
Síntesis y degradación de RA: Dentro del citoplasma, el retinol es oxidado a retinaldehído por acción de las alcohol-deshidrogenasas (ADHs) y las retinol-deshidrogenasas (RDHs), a su vez el retinaldehído es oxidado por las retinaldehído-deshidrogenasas (RALDHs) a RA. Las proteínas celulares de unión a RA (CRABPs) se asocian con RA para regular sus niveles internos y, dependiendo del tipo de CRABP, lo dirigen al núcleo para su señalización genómica o a su degradación por acción de las enzimas de la subfamilia citocromo P450 26 (CYP26) a metabolitos más polares. RA por un mecanismo aún desconocido se puede isomerizar para producir 9-cis-RA (9cRA), el ligando endógeno de los receptores de retinoide X (RXRs).



Continúa...

Continuación

Señalización de RA: El RA en el citoplasma puede salir de la célula y actuar de manera parácrina. Cuando entra al núcleo, RA se une al dominio de unión al ligando (LBD) de alguno de los subtipos de los receptores de ácido retinoico (RARs). Según el modelo canónico, previo a la unión de RA, los RARs heterodimerizan con los RXRs y reconocen elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs) dentro de las secuencias reguladoras de los genes blanco, mediante sus dominios de unión al DNA (DBD); el dímero RAR-RXR recluta entonces co-represores (N-CoR y SMRT) que reprimen la transcripción mediante la compactación de la cromatina. La unión de RA al LBD del RAR produce un cambio conformacional que permite la liberación de los co-represores y el reclutamiento de co-activadores (N-CoA) que descompactan la cromatina y promueven la transcripción de los genes blanco. La unión de únicamente 9cRA al LBD del RXR no promueve la transcripción, pero puede incrementar la actividad del dímero unido a RA. Finalmente, la señal es apagada mediante la degradación del RAR-RXR.



intermedio adyacente al campo de la extremidad, ésta expresión anormal era prevenida cuando se suplementaban a las ratonas gestantes con dosis fisiológicas de RA, las cuales rescataban la formación de los primordios. Esto llevó a proponer que RA no era necesario para el crecimiento o establecimiento de patrones en la extremidad, pero sí para establecer un ambiente permisivo, mediante la represión de FGF8 en el mesodermo intermedio, que permitiera la inducción del campo de las extremidades anteriores⁶⁰.

En la regeneración de la extremidad, el incremento en la concentración o tiempo de exposición de RA exógeno incrementa secuencialmente la formación de estructuras más proximales al sitio de amputación (Fig. 3C) dando como resultado la duplicación de estructuras a lo largo del eje próximo-distal o **duplicaciones próximo-distales**⁴⁹ (dPD). Esto hace suponer que RA podría tener un papel en la especificación de las estructuras proximales durante la regeneración, similar al modelo de las dos señales⁶¹, donde la formación de un gradiente de RA próximo-distal especificaría los valores posicionales proximales del campo (Fig. 4B). De esta manera el exceso de RA modificaría los valores heredados al campo morfogénico durante la desdiferenciación a estados más proximales. Varios retinoides se han detectado en el blastema de urodolos, entre ellos retinol, RA y su estereoisómero 9-cis-RA (9cRA)⁶²⁻⁶³. Curiosamente, se detectaron mayores niveles de RA en blastemas distales (al nivel de zeugópodo) que en blastemas proximales (estilópodo), lo cual va en contra del modelo de las dos señales; ya que un blastema proximal debe re-especificar estructuras más proximales que uno distal, es esperado que los niveles de RA fueran mayores en blastemas proximales. La detección de diversas proteínas de la vía de señalización de RA durante la regeneración⁶⁴⁻⁶⁸ además de diversos retinoides y la formación de dPD durante una exposición exógena a RA, fuertemente sugiere que la vía de señalización de RA está activa y

podiera tener un papel durante la regeneración de la extremidad, posiblemente relacionado con la re-especificación de los valores posicionales.

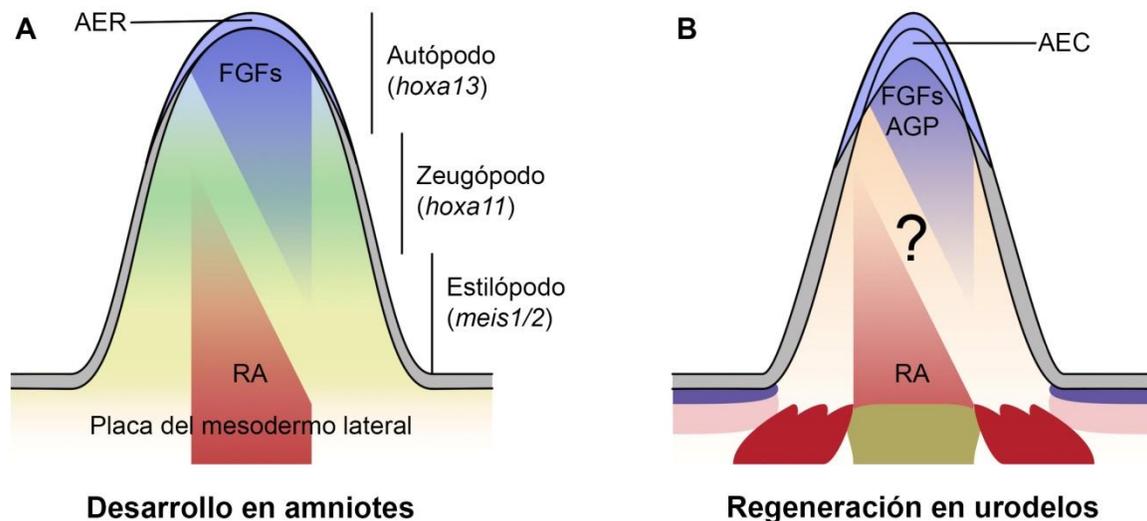


Figura 4. Modelos del establecimiento de patrones en la extremidad por RA.

A: Modelo de las dos señales en el desarrollo de la extremidad en amniotes. Las señales antagónicas de los FGFs de la AER y de RA, proveniente de la placa del mesodermo lateral, crean compartimentos a partir de la diferencia de la intensidad de ambas señales mediante la regulación de genes importantes para el establecimiento de patrones como los *hox* y *meis*. De esta manera RA establece los patrones de la estructura más proximal (estilópodo) mediante la expresión de *meis1/2*. **B:** En la regeneración de la extremidad de urodelos la AEC secreta mitógenos como FGF y AGP, debido a la inducción de dPD cuando se encuentra en exceso, el RA podría tener un papel similar al modelo de las dos señales estableciendo los patrones de las estructuras proximales que se regeneraran.

RARs, efectores funcionales del RA

RA ejerce sus funciones mediante la regulación transcripcional de genes blanco a través de su unión con los receptores nucleares de ácido retinoico (**RARs**) (Apéndice 2). Los RARs se componen, principalmente, de un dominio N-terminal con funciones reguladoras (NTD), uno de unión al DNA (DBD) y otro de unión al ligando (LBD)⁶⁹. En mamíferos existen los subtipos alfa, beta y gama codificados en genes distintos; la transcripción por distintos promotores y el empalme alternativo produce, además, isoformas de los distintos subtipos que varían en su NTD; existiendo así dos alfas (RARalfa1-2), cuatro betas (RARbeta1-4) y dos gamas (RARgama1-2)⁷⁰. Los RARs heterodimerizan con los receptores de retinoico “X” (**RXR**s) de los cuales también existen tres subtipos (alfa, beta y gama) y dos isoformas por cada uno (RXRalfa1-2, RXRbeta1-2 y RXRgama1-2). Su asociación con los RARs es únicamente como un adaptador, ya que la transactivación de los genes blanco de RA depende únicamente de la unión del ligando del RAR y

no del ligando del RXR, 9cRA⁷¹⁻⁷³. Estos receptores nucleares están altamente conservados entre especies, en urodelos existen dos isoformas de RARalfa y tres de RARgama⁷⁴⁻⁷⁸ al igual que los tres subtipos de RXRs⁷⁹. Era hasta hace poco aceptado que no existía RARbeta en urodelos, pero un trabajo reciente describe la expresión del RARbeta2 en el tritón *Notophthalmus viridescens*⁸⁰.

Los distintos heterodímeros RAR-RXRs, que pueden ocurrir con los distintos subtipos e isoformas, se unen a secuencias de reconocimiento en el DNA o elementos de respuesta a ácido retinoico (**RAREs**). Los RAREs se conforman por dos repeticiones directas del motivo consenso 5'-(A/G)G(T/G)TCA separadas por una, dos o cinco pares de bases y se encuentran en las regiones regulatorias de los genes blanco de RA. Los genes que contienen RAREs en sus secuencias reguladoras, identificados hasta el momento, incluyen genes de la vía de RA (*rarb2* y *cyp26A1*) y genes con funciones en diferenciación y establecimiento de patrones en el desarrollo (*foxA1*, *fgf8*, *hoxa1*, *hoxb1*, *hoxc4* y *hoxd4*)⁶⁹.

Según el modelo canónico de la señalización de RA (Apéndice 2), el heterodímero RAR-RXR se une al RARE en el gene blanco y reprime su expresión mediante el reclutamiento de correpresores (como N-CoR y SMRT) que mantienen el estado de la cromatina condensado. La unión de RA, el ligando del RAR, al LBD produce un cambio conformacional que lleva a la liberación de los corepresores y al reclutamiento de coactivadores (SCR3, AIB1 y ACTR) que alteran la estructura de la cromatina cerca del promotor del gene favoreciendo su activación⁶⁹.

Durante el desarrollo, la expresión de los distintos subtipos de RARs y RXRs es espacial y temporalmente regulada, lo que sugiere que cada subtipo y potencialmente cada heterodímero RAR-RXR podría tener funciones específicas. Por ejemplo RARalfa se expresan ubicuamente al igual que RXRalfa y RXRbeta, mientras que RARbeta, RARgama y RXRgama tienen patrones de expresión más restringidos a ciertos tejidos del embrión de ratón^{69, 73}. Estudios de ratones mutantes carentes de los distintos subtipos e isoformas (KO's) revelaron que existe una gran redundancia entre estos receptores aunque también se les puede asociar con ciertas funciones específicas⁸¹. En la extremidad del ratón se llegan a expresar los tres subtipos de RARs, sin embargo, malformaciones producidas por los KO's sólo se observaban cuando las mutaciones incluían al RARgama, lo que sugiere que RARgama ejerce una actividad predominante en el desarrollo de la extremidad⁸¹. En la regeneración de la extremidad en urodelos, la expresión de RARalfa1 y RARbeta2 parece ser más homogénea^{74, 80} mientras que RARalfa2 solamente se expresa en las extremidades posteriores⁷⁵, RARgama1 tanto en el blastema (mesénquima) como en el

epitelio de herida y RARgama2 únicamente en el blastema⁷⁶⁻⁷⁷. Los distintos subtipos también se asocian a actividades específicas durante la regeneración; la construcción de receptores quiméricos de las diferentes isoformas reemplazando el LBD por el dominio correspondiente del receptor de la hormona tiroidea permitió la activación específica de las distintas isoformas usando la hormona T3 en lugar de RA. De esta manera mostraron que RARalfa1 puede regular negativamente el crecimiento *in vitro* de células del blastema⁸². La transgénesis de estos receptores quiméricos por biolística también mostró que RARgama1 puede tener una función en regular la maduración del epitelio de herida al regular la expresión del marcador molecular WE3⁸³; mientras que el RARgama2 pudiera estar encargado de regular la identidad posicional de las células, ya que su activación produce la traslocación de las células a zonas más proximales del blastema⁸⁴. No obstante, muy posiblemente por las limitaciones técnicas de la biolística, no se observaron los fenotipos clásicos de RA en la regeneración *in vivo*, como las dPD, al activar específicamente al RARgama2.

Planteamiento del problema

La regeneración de la extremidad en urodelos es un excelente modelo para estudiar el establecimiento de patrones; la regla de la transformación distal nos permite observar la regulación de los límites de un campo morfogenético y sus valores posicionales a lo largo del eje próximo-distal.

La presencia de agentes de la vía de RA durante la regeneración, las dPD producidas por una exposición a retinoides exógenos y las funciones que se le han asignado en el establecimiento de patrones en diversos sistemas embrionarios, incluyendo la extremidad, sugieren que RA podría tener un papel importante para la especificación de los valores posicionales del eje próximo-distal en la regeneración. Es importante entender cuáles son los agentes que participan en este proceso. Ya que las funciones de RA dependen totalmente de su unión con los RAR-RXRs y éstos tienen funciones específicas predominantes en algunos sistemas, es suposible que los distintos subtipos tengan funciones específicas también en la regeneración de la extremidad. Estudios previos ya sugieren que esta hipótesis es factible y que los RARs podrían tener funciones en la maduración del epitelio, el control de la proliferación celular y de la especificación de los valores posicionales, sin embargo, no existe evidencia fenotípica *in vivo* que sustente estas ideas. Asimismo, no existe evidencia hasta la fecha de que los acompañantes de los RARs, los RXRs, tengan alguna función durante la regeneración. Este trabajo se enfoca en determinar las posibles funciones específicas

de los efectores de la vía de RA, los RARs y RXRs, durante la regeneración de la extremidad de urodelos.

Objetivos

General

Para entender las funciones específicas que pudieran tener los RARs y RXRs se determinará si la activación farmacológica específica de éstos produce fenotipos distintos durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*.

Particulares

-Establecer qué fenotipos se obtienen como resultado a la exposición exógena a agonistas y antagonistas específicos de los RARalfa y RARgama (Tabla 1) durante los primeros días de la regeneración en amputaciones a dos niveles del eje próximo-distal.

-Determinar cuál de los subtipos de receptores podría ser responsable de la re-especificación de los valores posicionales al producir las dPD.

-Comprobar si los RXRs tienen alguna función durante la regeneración, así como en la formación de dPD, con la exposición a agonistas y antagonistas de panRXRs (Tabla 1).

Tabla 1. Fármacos usados en este trabajo

Fármaco	Acción
Am580	Agonista del RARalfa
CD1530	Agonista del RARgama
Ro41-5253	Antagonista del RARalfa
CD2665	Antagonista del RARgama
DHA (Ácido docosahexaenoico)	Agonista inespecifico de los RXRs
UVI3003	Antagonista inespecífico de los RXRs
R115866	Inhibidor de la CYP26

RESULTADOS

La activación farmacológica de los RARalfa y gama retrasan la regeneración y producen dPD o inhiben la regeneración de manera similar

RA ejerce su actividad únicamente a través de los RARs⁶⁹, por lo que la activación directa de alguno de los receptores podría replicar alguno de los efectos de los tratamientos con RA durante la regeneración de la extremidad en el ajolote⁴⁹⁻⁵⁰. Por esto, decidimos primeramente tratar a los animales con los agonistas específicos del RARalfa y del RARgama (Am580 y CD1530 respectivamente, Tabla 1), subtipos cuya expresión se reportó previamente en *A. mexicanum*⁷⁴⁻⁸⁰. Los tratamientos se realizaron durante los primeros días post-amputación cuando la inducción de dPD es mayor. Los animales eran amputados proximal y distalmente para tener dos sistemas en donde los límites morfogénéticos proximales son distintos, según la regla de la transformación distal, ya que nos podrían revelar dependencias distintas en la activación de los RARs.

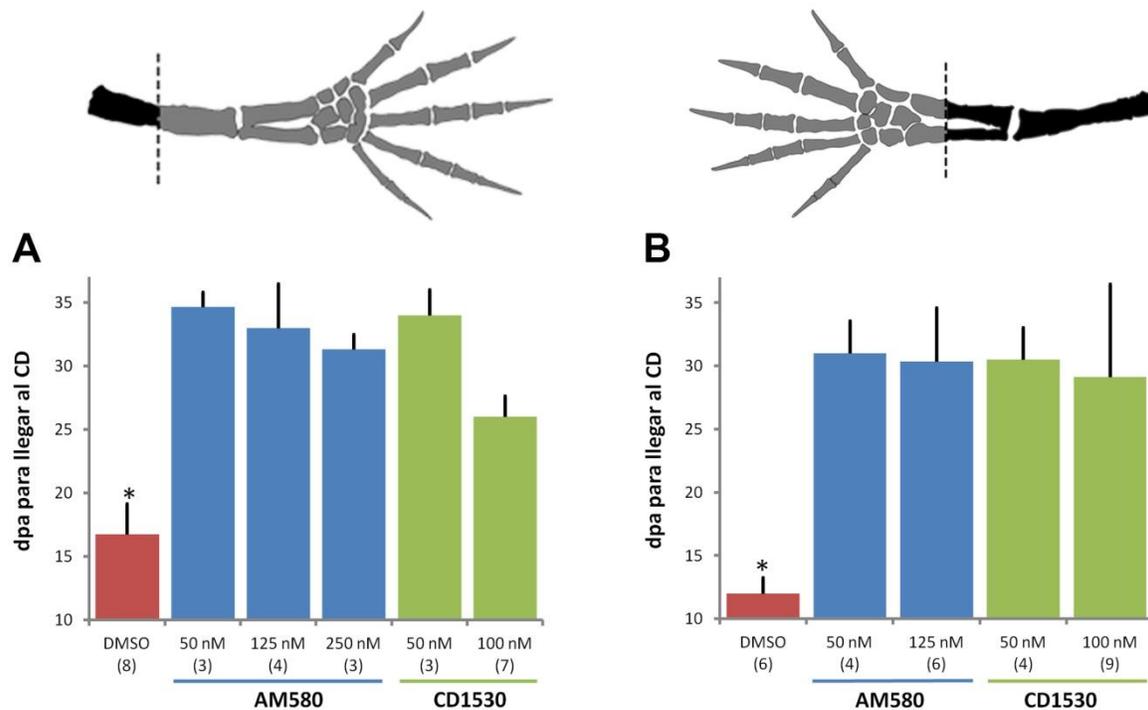


Figura 5. Los agonistas de los RARalfa (Am580) y RARgama (CD1530) retrasan la regeneración.

Gráfica del tiempo en días que tardaron los animales en llegar a la fase de crecimiento de dígitos (CD) en amputaciones proximales (A) y distales (B) tratados con distintas concentraciones de AM580 o CD1530. *p<0.005. Números entre paréntesis indican la n experimental.

La administración de RA exógeno produce un retraso en la regeneración⁴⁹, de igual manera Am580 y CD1530 retrasaron significativamente la regeneración. Tanto en amputaciones proximales como distales y en todas las concentraciones usadas, los regenerados que fueron tratados tardaron entre 15 a 20 días más que los controles con el vehículo (DMSO) para llegar al estadio de crecimiento de dígitos (CD) (Fig. 5A y 5B).

Tabla 2. Sistema de calificaciones de duplicaciones próximo-distales

Estructuras duplicadas	Calificación
Ninguna	0
Tarsos	1
Tibia-fíbula parcial	2
tibia-fíbula completa	3
Fémur parcial	4
Fémur completo	5
Hueso pélvico parcial	6

Basado en referencias 49-50

Al igual que RA⁴⁹, los agonistas produjeron dPD en amputaciones proximales (Fig. 6B-C') y distales (Fig. 6E-6F). El grado de duplicación fue determinado con el sistema de calificaciones implementado por Maden⁴⁹⁻⁵⁰ (Tabla 2). El porcentaje de dPD y la calificación de duplicación promedio fueron muy similares con los dos agonistas en todas las condiciones (Tabla 3). En amputaciones proximales, el tratamiento con Am580 produjo una calificación promedio de 6 a todas las concentraciones y un mayor porcentaje de duplicaciones a la dosis más baja (75 % de los casos a 50 nM), mientras que con CD1530 la calificación promedio fue de aproximadamente 5 y la dosis efectiva (~76 %) fue a 100 nM. En cambio, en las amputaciones distales ambos fármacos fueron eficaces (100 %) a una concentración de 50 nM con una calificación promedio de 4.25 que subió hasta 6 en la dosis más alta usada (250 nM). En ninguno de los 11 controles proximales y 6 distales tratados con el vehículo DMSO se observaron dPD (Fig. 6A y 6D). Curiosamente, los controles distales con DMSO regeneraban únicamente 4 dedos (Fig. 6D). Por el número y largo de las falanges se determinó que el dígito faltante era el IV, los tarsos regenerados también se

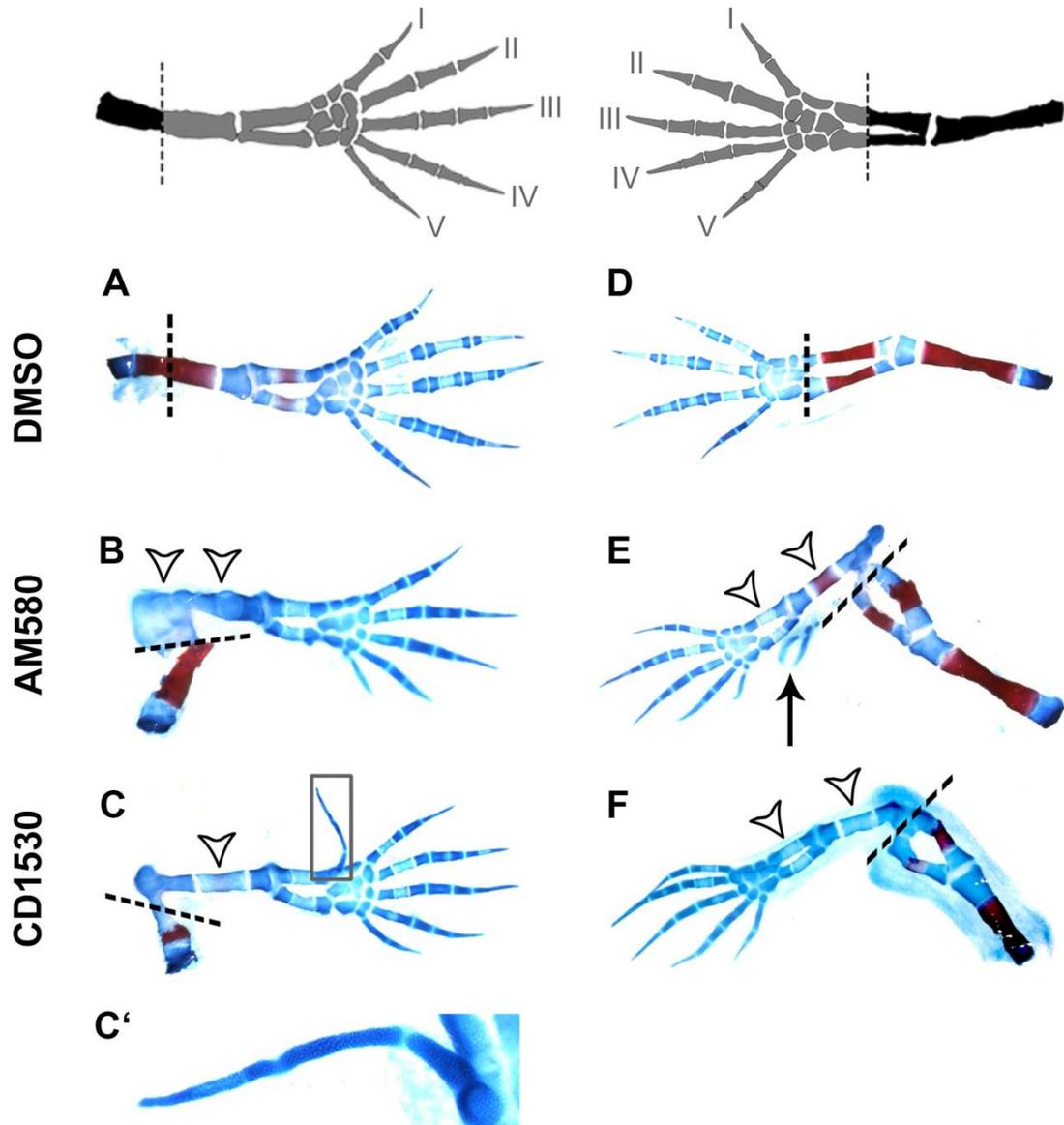
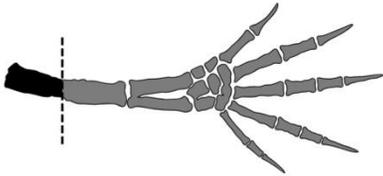
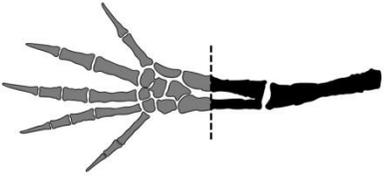


Figura 6. Am580 y CD1530 producen duplicaciones próximo-distales.

Estructuras esqueléticas regeneradas (dpa50), teñidas con azul alciano y rojo alizarina. Amputaciones proximales (A-C) o distales (D-F) tratadas con el vehículo DMSO (A y D), Am580 (B y E) o CD1530 (C y F). Las líneas punteadas marcan el sitio de la amputación original. Cabezas de flecha marcan las estructuras duplicadas en las dPD. Flecha en E marca un elemento ectópico. C' es un acercamiento del dedo ectópico del recuadro en C.

mostraban en una formación más angosta y reducían su número normal de 9-10 a 7, los tarsos faltantes incluyeron los adyacentes a los metatarsos de los dedos III-V reduciéndose a un solo tarso extendido de donde protruyen los dedos III y V (Comparar Fig. 6A y 6D). Este hipomorfismo

Tabla 3. Porcentajes de fenotipos de los tratamientos con los agonistas Am580 y CD1530 en amputaciones proximales y distales.

Tratamiento	[nM]								
		n	Normal	dPD/calif.	NR	n	Normal	dPD/calif.	NR
DMSO		11	100	0	0	6	100	0	0
	50	4	0	75/6	25	4	0	100/4.25	0
Am580	125	9	0	44.44/6	55.56	7	0	85.71/4.33	14.29
	250	8	0	50/6	50	6	0	50/6	50
	50	7	42.86	42.86/5	14.29	4	0	100/4.25	0
CD1530	100	17	0	76.47/4.85	23.53	11	0	81.82/3.44	18.18
	250	2	0	0	100	2	0	50/6	50

dPD = duplicaciones Proximo-Distales

NR = No Regeneró

calif. = calificación de duplicación promedio (Tabla 2)

ocurrió únicamente en las amputaciones distales y no proximales, por lo que se pueden descartar como un efecto del DMSO.

Otro fenotipo recurrente con los agonistas fue la total inhibición de la regeneración, en estos casos no se observó la formación evidente de un blastema, cortes histológicos de muñones al dpa50 no mostraron una acumulación de células desdiferenciadas al extremo distal del muñón (Fig. 7), pero sí una continua y prominente membrana basal a lo largo de toda la epidermis incluyendo el epitelio de la herida, tanto en amputaciones proximales como distales (Fig. 7C') mostrando que la regeneración fue prevenida y no solo retrasada. El porcentaje de muñones que no regeneraron (NR) fue mayor en las dosis más altas de ambos tratamientos (Tabla 3).

Los agonistas, Am580 y CD1530, retrasaron de manera similar la regeneración, produjeron dPD e inhibieron la regeneración en porcentajes equivalentes. Todos estos efectos también son observados con RA, por lo que los tratamientos con ambos agonistas replicaron efectivamente los efectos de RA durante la regeneración de la extremidad. Sin embargo, no pudimos observar alguna diferencia entre los tratamientos que pudiera sugerir funciones distintas que pudieran tener RARalfa y RARgamma.

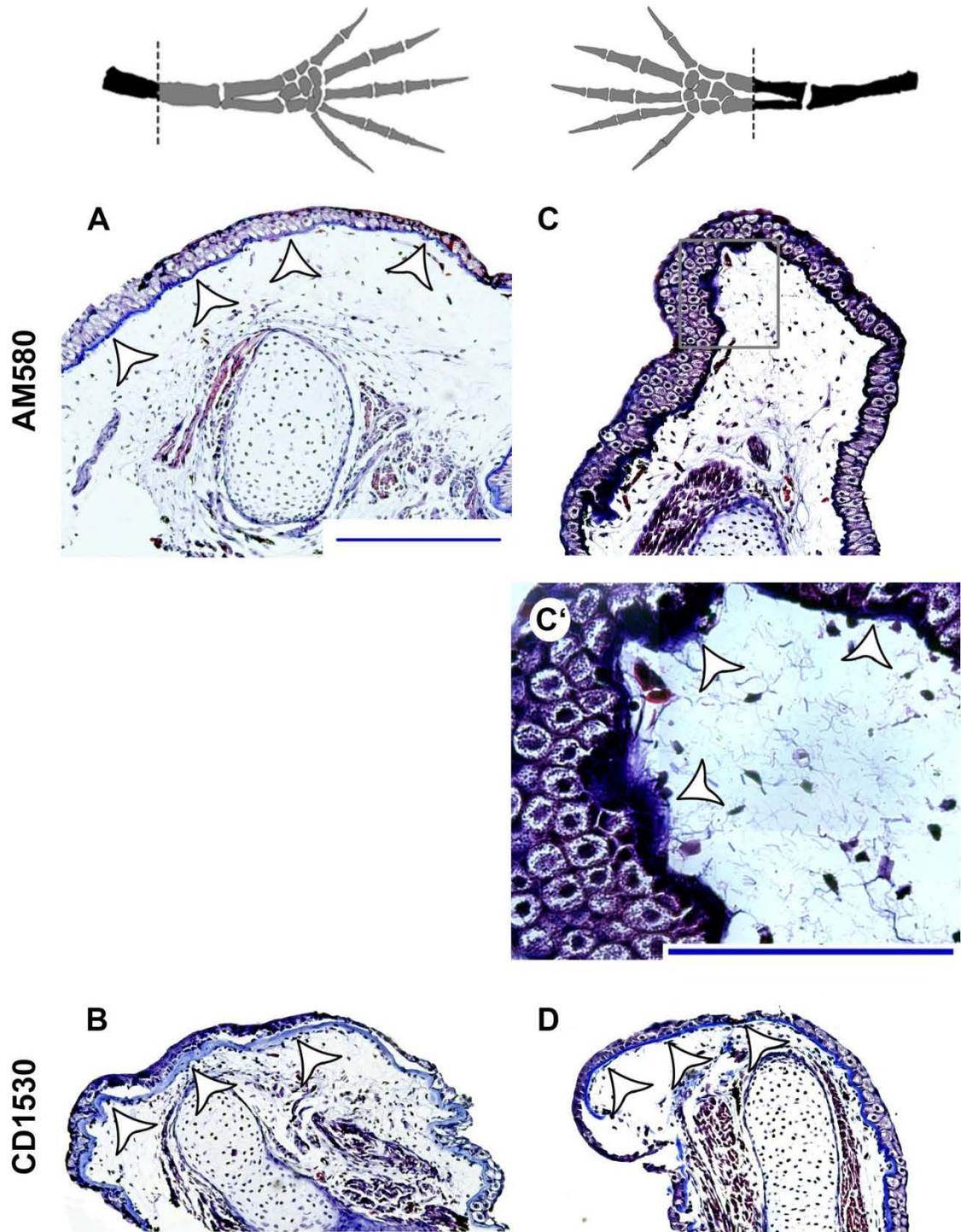


Figura 7. Am580 y CD1530 inhiben la regeneración.

Cortes histológicos teñidos con la tinción tricrómica de Masson de muñones que no regeneraron al dpa50 por amputaciones proximales (A-B) o distales (C-D) tratados con Am580 (A y C) o CD1530 (B y D) escala en A 200 um. C': acercamiento del recuadro en C escala 500 um. Cabezas de flecha señalan la membrana basal continua en el ápice del muñón.

Am580 induce la formación de la membrana basal e incrementa la expresión de *mmp9*

La presencia de membrana basal a lo largo de la epidermis en muñones que no regeneraron sugiere que la remodelación de la membrana basal pudiera estar afectada (Fig. 7). Durante la regeneración, la remodelación de la membrana basal bajo el epitelio de herida mantiene la comunicación entre el epitelio de herida y las células subyacentes. Si esta comunicación es interrumpida la regeneración se inhibe⁸⁵. La remodelación se cree que es producida por la degradación de la matriz extracelular por la actividad proteolítica, principalmente, de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), ya que si se inhibe farmacológicamente la actividad de estas enzimas la regeneración también se ve inhibida⁸⁶. Varias MMPs son expresadas durante la regeneración y, particularmente, el tratamiento con retinoides reduce la expresión de MMP9⁸⁷. Por esto especulamos que, la inhibición de la regeneración pudo ser causada por una inadecuada remodelación de la membrana basal debida a una baja en la expresión de las MMPs causada por los tratamientos con Am580 y CD1530.

Para determinar si la formación de la membrana basal bajo el epitelio de herida es la causa de la inhibición de la regeneración en nuestros tratamientos y si ésta correlaciona con una alteración en la expresión de MMP9, se trataron amputaciones proximales y distales con DMSO o Am580 a la dosis más alta usada, en la que el 50 % de los casos se inhibió la regeneración. Posteriormente se recolectaron los muñones al término del tratamiento (dpa6), una semana después (dpa13) o hasta el dpa50 como controles de fenotipo. Se hicieron cortes seriados de los muñones y se tiñeron con la TTM para detectar la membrana basal mientras que en cortes consecutivos se les realizó una hibridación in situ contra *mmp9* (Fig. 8).

En los controles con DMSO, al dpa6 los muñones proximales se encontraban en el estadio de desdiferenciación mostrando una pequeña acumulación de células adyacentes al epitelio de herida las cuales se marcaron positivas a la expresión de *mmp9* (Fig. 8A-B), en ningún caso se observó la presencia de una membrana basal junto al epitelio de herida (Fig. 8A' y Tabla 4). Por otro lado, los muñones distales ya habían formado un blastema y tampoco se observó la presencia

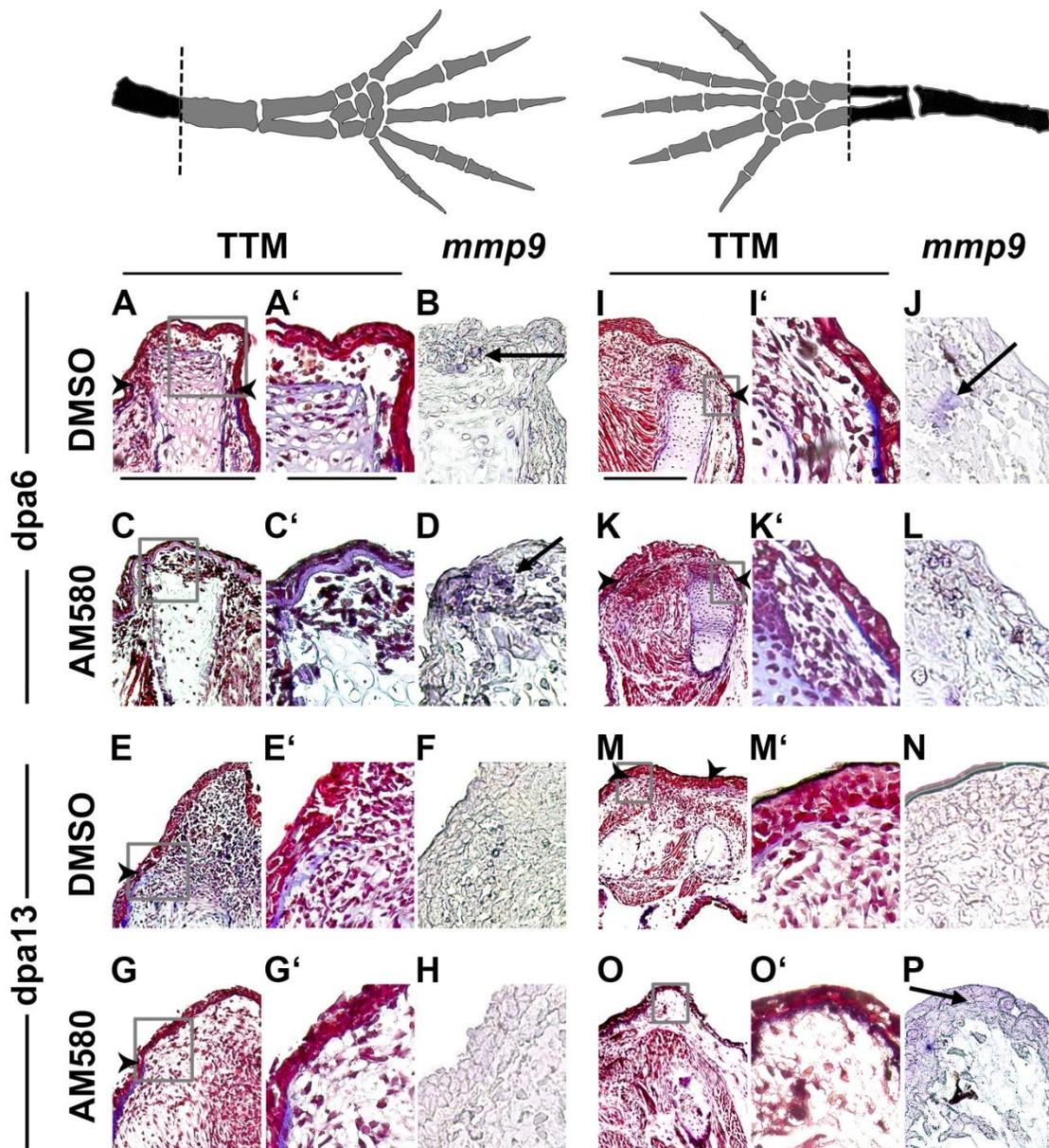
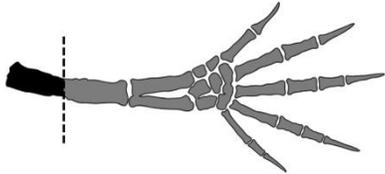
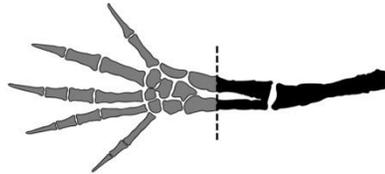


Figura 8. Am580 induce la formación de una membrana basal precoz y se correlaciona con un incremento en la expresión de *mmp9*.

Cortes histológicos longitudinales de muñones amputados proximal (A-H) ó distalmente (I-P), tratados con DMSO (A-B, E-F, I-J y M-N) o Am580 [250nM] (C-D, G-H, K-L y O-P) y recolectados al dpa6 (A-D e I-L) o al dpa13 (E-H y M-P). Los cortes seriados fueron teñidos con la tinción tricrómica de Masson (A, C, E, G, I, K, M y O) o se les realizó una hibridación *in situ* contra *mmp9* (B, D, F, H, J, L, N y P). Las cabezas de flecha indican el límite distal de la membrana basal y las flechas señalan la marca de la sonda hibridada. Las letras primas son aumentos de los recuadros de las letras normales. Escalas 500 um (A e I) y 200 um (A'); la escala de A es igual para C, E y G mientras que la de I para K, M y O, la escala de A' es igual para las letras primas y las hibridaciones *in situ*.

de membrana basal, en algunos casos se detectó expresión de *mmp9* en células asociadas al cartílago pero no en el epitelio de herida o blastema (Fig. 8I-J y Tabla 4). Al dpa13 los controles proximales ya habían llegado a un blastema tardío sin mostrar aún la presencia de membrana basal y tampoco se detectó expresión de *mmp9*, al igual que en las amputaciones distales (Fig. 8E-F, M-N y Tabla 4). Los patrones de expresión de *mmp9* en los controles son consistentes con reportes previos⁸⁷ donde su expresión ocurre en fases tempranas de la regeneración y luego se limita al mesénquima adyacente al cartílago en los estadios del blastema (Fig. 8B y J).

Tabla 4. Presencia de membrana basal y expresión de *mmp9* en amputaciones proximales y distales tratadas con 250nM de Am580.

					
Tratamiento		Membrana basal	<i>mmp9</i>	Membrana basal	<i>mmp9</i>
dpa6	DMSO	0/2	+	0/2	+/-
	Am580	3/4	+	0/5	+
dpa13	DMSO	0/1	-	0/1	-
	Am580	0/5	+/-	1/5	+
		NR		NR	
dpa50	Am580	2/3		0/3	

+ = Todos los casos +/- = En algunos casos - = Ningun caso NR = No Regeneró

En el caso de los tratados con Am580, al dpa6 los muñones proximales también mostraron una acumulación de células bajo el epitelio de herida. Notablemente, en la mayoría de los casos se observó una prominente membrana basal bajo el epitelio acompañada inesperadamente, de una mayor expresión de *mmp9* (Fig. 8C-D y Tabla 4). Este fenómeno no se observó en las amputaciones distales (Fig. 8K-L y Tabla 4). Para el dpa13, los amputados proximales se encontraban en un blastema medio y en ningún caso se observó una membrana basal bajo el epitelio y solo en algunos casos se detectó expresión de *mmp9* (Fig. 8G-H y Tabla 4). En los amputados distales, solamente un caso mostró presencia de membrana basal contigua al epitelio aunque no tan prominente, en todos los casos se detectó expresión de *mmp9* (Fig. 8O-P y Tabla 4).

El tratamiento con Am580 produjo la formación precoz al *dpa6* de membrana basal bajo el epitelio de herida en amputaciones proximales pero no distales, lo cual correlacionó con que en los controles de fenotipo la mayoría de los proximales no regeneraron mientras que todos los distales lo hicieron; de igual manera, la presencia de una membrana basal se correlacionó con una mayor expresión de *mmp9* (Tabla 4).

La activación del RARgama es responsable de las dPD

Los resultados de los tratamientos con Am580 y CD1530 no sugieren funciones distintas para el RARalfa y RARgama durante los primeros días de la regeneración de la extremidad del ajolote. Sin embargo, es posible que bajo nuestro esquema de administración uno o ambos fármacos fueran inespecíficos y estuviéramos activando indiferentemente ambos receptores, por esto decidimos probar una aproximación opuesta. Bloqueamos la actividad de los receptores con antagonistas específicos del RARalfa y RARgama (Ro41-5253 y CD2665, Tabla 1). Adicionalmente, para determinar si las dPD son resultado de la actividad de uno de estos RARs, se indujeron dPD administrando un inhibidor de las CYP26 (R115866, Tabla 1) con el mismo esquema en combinación con los antagonistas, buscando rescatar el fenotipo normal. Las CYP26 son las enzimas encargadas de la oxidación de RA a metabolitos menos activos, por lo que su inhibición incrementaría la concentración endógena de RA y replicaría los efectos por administración exógena de RA y las dPD.

Los antagonistas, solos o combinados, no afectaron significativamente el tiempo de regeneración (Fig. 9) ni las estructuras esqueléticas con respecto al eje próximo-distal (Fig. 10A-C, G-I y Tabla 5), en ambos niveles de amputación, más allá de las observadas en los controles con DMSO (Fig. 6A y D). Notablemente, los tratamientos con CD2665 usualmente producían fusiones de los metacarpos en los dígitos III y IV (sindactilias) en ambas amputaciones (Fig. 10B, C, F, H, I y Tabla 5).

Los tratamientos con el inhibidor R115866, similar con los agonistas, retrasaron significativamente la regeneración en amputaciones proximales y distales (Fig. 9). En amputaciones proximales, la dosis más baja usada produjo dPD con una calificación de duplicación promedio de 5.8 el cual subió hasta 6 en la dosis más alta (Fig. 10D y Tabla 5); a esta dosis, en la mitad de los casos se inhibió la regeneración (Tabla 5). Mientras que en amputaciones distales se produjeron dPD con una calificación promedio de 3.2 con la dosis más baja (Fig. 10J y Tabla 5) y se inhibió la regeneración en todos los casos con la dosis alta (Tabla 5).

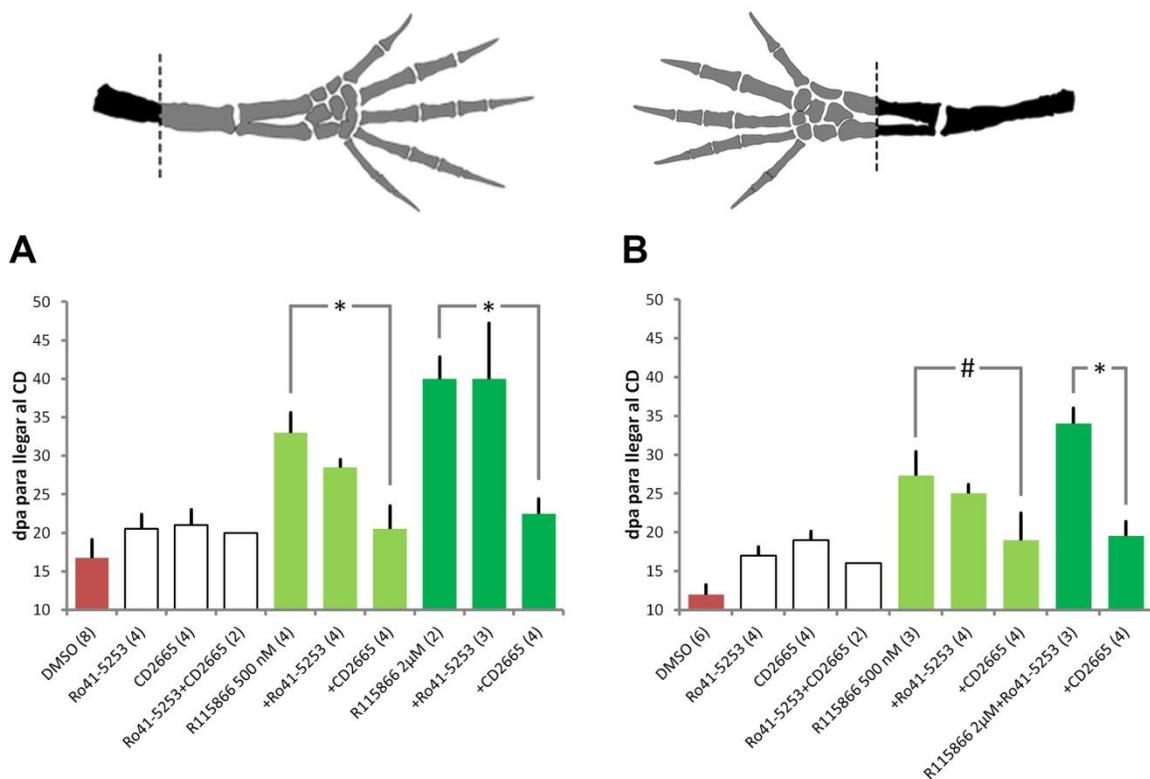


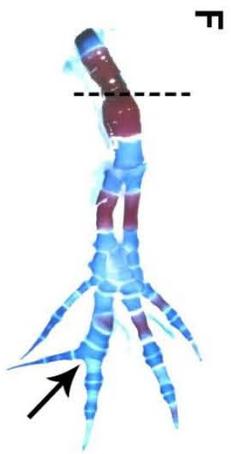
Figura 9. El retraso en la regeneración producido por un exceso de RA endógeno es dependiente de RARGama.

Gráfica del tiempo en días que tardaron los animales en llegar a la fase de crecimiento de dígitos (CD) en amputaciones proximales (A) o distales (B) con los distintos tratamientos. *p < 0.005 #p < 0.05. Números entre paréntesis indican la n experimental.

La combinación R115866 con Ro41-5253 continuó retrasando la regeneración significativamente con respecto al tratamiento con sólo Ro41-5253 (Fig. 9). En las amputaciones proximales persistían las dPD con una calificación de 5.1 y hasta 6 en la dosis más alta de R115866 (Fig. 10E y Tabla 5) en la cual en un solo caso se inhibió la regeneración (Tabla 5). De igual manera, en amputaciones distales las dPD tuvieron una calificación más baja de 2.3 y hasta 5.7 en la dosis alta (Fig. 10K y Tabla 5), a ésta dosis en un solo caso se inhibió la regeneración (Tabla 5).

En contraste, la combinación con CD2665 significativamente abatió el retraso en la regeneración producido por R115866 hasta el nivel del tratamiento con únicamente CD2665, inclusive a la dosis más alta de R115866 (Fig. 9). En las amputaciones proximales, solamente un caso produjo dPD con una calificación de 4 (no mostrado). Mientras que el resto de las amputaciones proximales y todas las distales no produjeron dPD ni mostraron ninguna afección en las estructuras esqueléticas más allá de las observadas en los tratados con sólo CD2665 (Fig. 10F, L y Tabla 5).

R115866
+CD2665



R115866
+Ro41-5253



R115866



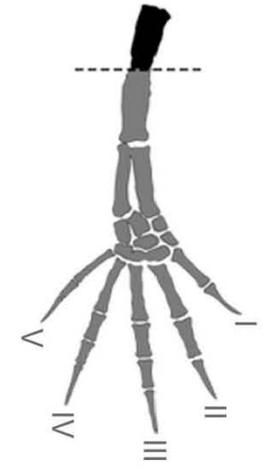
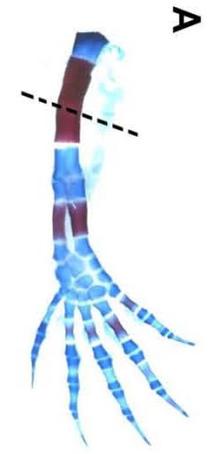
Ro41-5253
+CD2665



CD2665



Ro41-5253



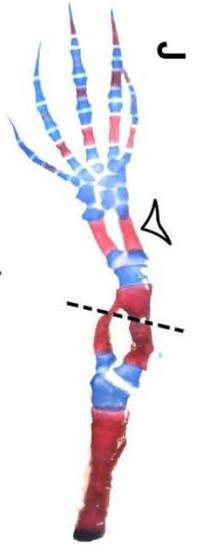
L



K



J



I



H



G

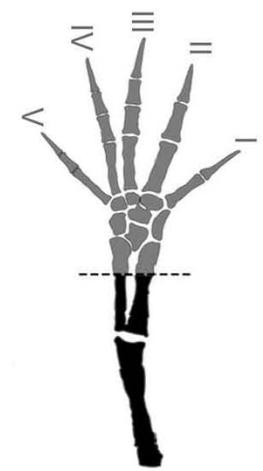
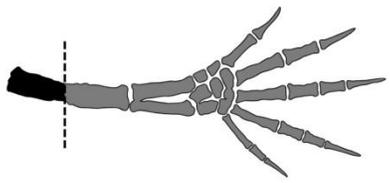
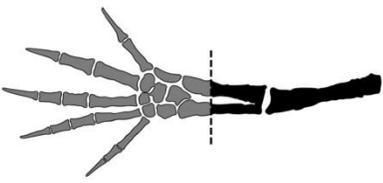


Figura 10. Las dPD producidas por un exceso de RA endógeno son dependientes de RARgama.

Estructuras esqueléticas regeneradas (dpa50), teñidas con azul alciano y rojo alizarina, por amputaciones proximales (A-F) o distales (G-L) tratadas con Ro41-5253 (A y G), CD2665 (B y H), Ro41-5253+CD2665 (C e I), R115866 (D y J), R115866+Ro41-5253 (E y K) o R115866+CD2665 (F y L); las líneas punteadas marcan el sitio de la amputación original. Flechas marcan las sindactilias de los dígitos III y IV. Cabezas de flecha marcan las estructuras duplicadas en las dPD.

Tabla 5. Porcentajes de fenotipos de los tratamientos con el inhibidor de la CYP26 R115866 y los antagonistas Ro41-5253 y CD2665 en amputaciones proximales y distales.

Tratamiento [nM]										
	n	N	Sd	dPD/calif.	NR	n	N	Sd	dPD/calif.	NR
Ro41-5253 500	4	100	0	0	0	4	75	25	0	0
CD2665 500	4	0	100	0	0	4	25	75	0	0
R115866 500	6	0	16.7	100/5.8	0	6	0	0	83.3/3.2	16.7
+Ro41-5253 500	8	0	0	100/5.1	0	8	0	25	100/2.3	0
+CD2665 500	7	57.1	42.9	14.3/4	0	7	71.4	28.6	0	0
R115866 2000	4	0	0	50/6	50	4	0	0	0	100
+Ro41-5253 500	4	0	0	75/6	25	4	0	25	75/5.7	25
+CD2665 500	4	50	50	0	0	4	75	25	0	0

N = Normal Sd = Sindactilia dPD = duplicaciones Próximo-distales NR = No Regeneró calif. = calificación de duplicación promedio (Tabla 2)

A diferencia con los agonistas, los regenerados tratados con los antagonistas si produjeron fenotipos diferentes. Los tratamientos con CD2665 produjeron sindactilias en los dígitos III y IV, esto no se observó en los tratados con Ro41-5253. De igual manera, solamente CD2665 y no Ro41-5253 pudo prevenir la formación de dPD producidas por R115866.

Los RXRs podrían modular la actividad de los RARs

Los RARs usualmente heterodimerizan con los RXRs, los cuales funcionan sólo como un adaptador y no regulan directamente la activación transcripcional de los genes blanco, sin embargo la activación del RXR puede incrementar la actividad del complejo RAR-RXR⁸⁸. El ligando natural de los RXRs es el 9cRA⁷³ el cual es activamente sintetizado en el epitelio de herida⁶³ y también es

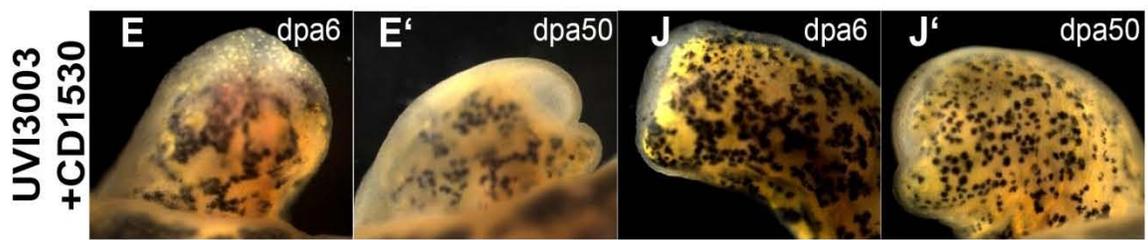
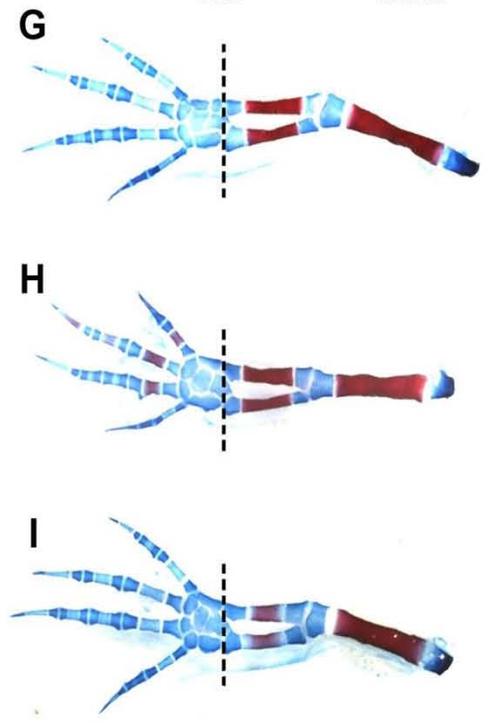
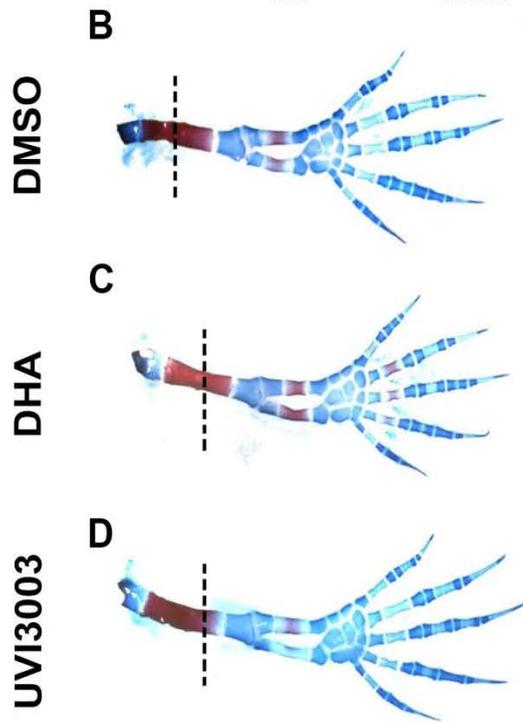
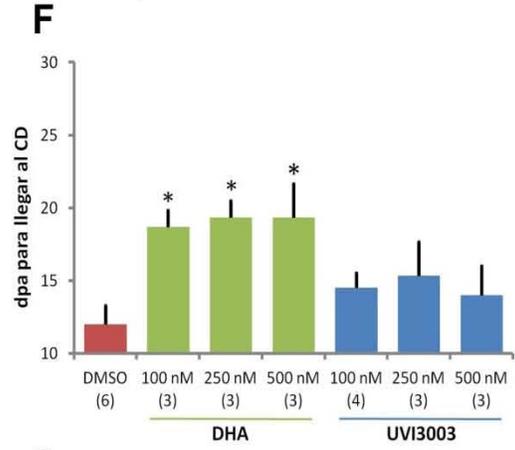
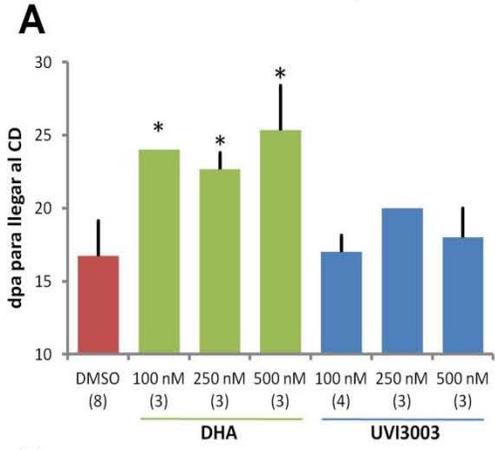
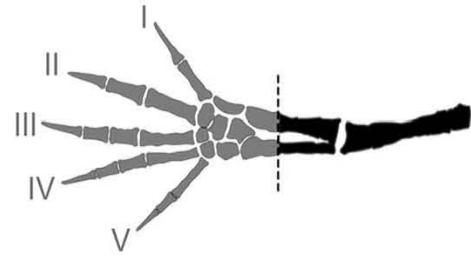
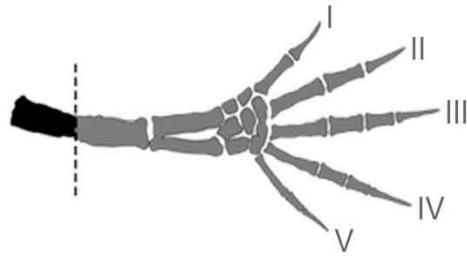


Figura 11. Actividad de los RXRs durante la regeneración.

A-B: Gráfica del tiempo en días que tardaron los animales en llegar a la fase de crecimiento de dígitos (CD) en amputaciones proximales (**A**) o distales (**B**) tratadas con distintas concentraciones de DHA o UVI3003. **p* < 0.005. Números entre paréntesis indican la *n* experimental. **B-D** y **G-I:** Estructuras esqueléticas regeneradas (dpa50), teñidas con azul alciano y rojo alizarina, por amputaciones proximales (**B-D**) o distales (**G-I**) tratadas con DMSO (**B** y **G**), DHA (**C** y **H**) o UVI3003 (**D** e **I**). **E** y **J:** Micrografías de muñones tratados con UVI3003+CD1530 [100 nM] al dpa6 (**E** y **J**) y al dpa50 (**E'** y **J'**).

Tabla 6. Porcentajes de fenotipos de los tratamientos con el agonista DHA y el antagonista UVI3003 de los RXRs en amputaciones proximales y distales.

Tratamiento [nM]	n	Amputación proximal			Amputación distal				
		Normal	dPD/calif.	NR	n	Normal	dPD/calif.	NR	
DHA	100	3	100	0	0	3	100	0	0
	250	3	100	0	0	3	100	0	0
	500	3	100	0	0	3	100	0	0
UVI3003	100	4	100	0	0	4	100	0	0
	250	3	100	0	0	3	100	0	0
	500	3	100	0	0	3	100	0	0
CD1530	100	17	0	76.47/4.85	23.53	11	0	81.82/3.44	18.18
	100	3	0	33.33/5	66.67	3	0	33.33/4	66.67
+UVI3003	250	3	0	33.33/5	66.67	3	0	0	100
	500	3	0	33.33/5	66.67	3	0	0	100

dPD = duplicaciones Proximo-Distales

NR = No Regeneró

calif. = calificación de duplicación promedio (Tabla 2)

capaz de producir dPD cuando se administra exógenamente⁸⁹. Esto sugiere que los RXRs podrían tener una actividad durante la regeneración de la extremidad, posiblemente de manera sinérgica con los RARs. Para determinar si los RXRs tienen alguna función durante la regeneración, se usó un pan-agonista (DHA, Tabla 1) o un pan-antagonista (UVI3003, Tabla 1) de los RXRs bajo el mismo esquema de administración de los fármacos de los RARs.

Los tratamientos con DHA, pero no con UVI3003, retrasaron significativamente la regeneración en amputaciones proximales y distales, aunque no tanto como con Am580, CD1530 o R115866 (Fig. 11A y F). Ni DHA ni UVI3003 tuvieron efectos en las estructuras esqueléticas regeneradas fuera de los vistos en los controles (Fig. 11B-D, G-I y Tabla 6).

Para determinar si la activación de los RXRs es necesaria para la actividad de los RARs, se combinaron los tratamientos con CD1530, a una concentración efectiva para producir dPD, junto con el pan-antagonista UVI3003. A diferencia del tratamiento con CD1530 que producía preferentemente dPD; el tratamiento combinado inhibió la regeneración en la mayoría de los casos en todas las concentraciones probadas de UVI3003 tanto en amputaciones proximales y distales (Fig. 10E-E', J-J' y Tabla 6).

Los resultados con DHA sugieren que los RXRs pudieran ser parcialmente responsables del retraso en la regeneración por un exceso de señalización de RA. Mientras que el tratamiento con UVI3003 no muestra que los RXRs pudieran tener una función activa durante la regeneración normal, no obstante, la combinación con CD1530 sugiere que los RXRs podrían modular la intensidad de la actividad de los RARs.

La activación de los RARs produce duplicaciones especulares

En casos excepcionales durante los diversos tratamientos se llegaron a duplicar especularmente las estructuras regeneradas (Fig. 12). Estos casos ocurrieron únicamente en amputaciones proximales y con los tratamientos de Am580 (3/21), CD1530 (3/29), UVI3003+CD1530 (2/9) y R115866+Ro41-5253 (1/12), no mostraron una recurrencia preferencial a alguno de los tratamientos. Las estructuras duplicadas eran copias especulares que surgían de la región palmar de la extremidad regenerada, por lo que las estructuras especulares tenían un eje dorso-ventral invertido con respecto al eje del muñón y del regenerado. La cantidad de estructuras duplicadas podían incluir solamente falanges que se originaban de los metatarsos del regenerado original (Fig. 12A) o de uno a tres dígitos completos adyacentes a los tarsos del regenerado (Fig. 12B). En un caso, las estructuras especulares incluían cuatro dígitos, tarsos y un fragmento distal de tibia (Fig. 12C). En casos más severos las estructuras especulares incluían un fémur que se originaba de la base del fémur regenerado, éste incluía tibia y un dígito (Fig. 12D). En un sólo caso toda una copia de la extremidad se originó de la base del fémur regenerado (Fig. 12E). Las duplicaciones especulares surgían preferentemente a partir de estructuras anteriores. El dígito I era invariablemente duplicado (Fig. 12A-E), mientras que sólo en pocos casos se duplicaban los dígitos

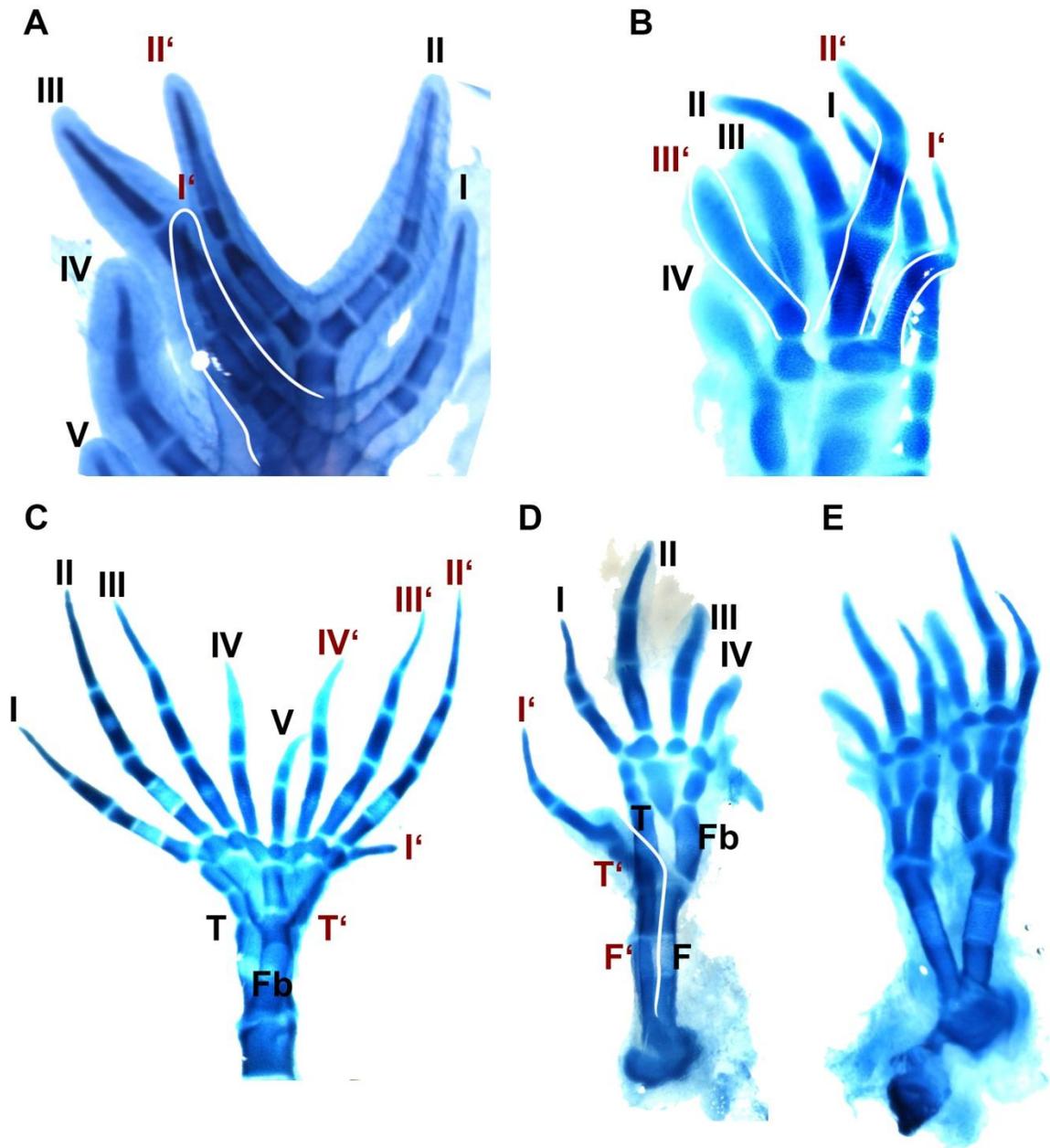


Figura 12. Duplicaciones especulares en amputaciones proximales.

Estructuras esqueléticas teñidas con azul alciano y rojo alizarina. La duplicación de estructuras podía ocurrir a nivel de metatarsos (A), tarsos (B), tibia (C) o fémur (D-E). Números romanos y letras prima en rojo marcan los dígitos y estructuras duplicadas.

más posteriores (Fig. 12B-C y E). De igual manera los tarsos anteriores y la tibia eran duplicados (Fig. 12C-D) y no así la fíbula. La formación de duplicaciones especulares sugiere que los

tratamientos pudieron, de alguna forma seguramente indirecta, modificar a los ejes antero-posterior y dorso-ventral.

DISCUSIÓN

RA en la regeneración e identidad posicional

La señalización de RA no es necesaria durante los primeros estadios de la regeneración

Nuestro esquema de administración nos permite determinar la importancia de la vía de señalización del RA durante los primeros procesos de la regeneración; cierre de herida, desdiferenciación y formación del blastema. Independientemente del papel endógeno específico que pudiera tener el RA en estos procesos, diversos trabajos farmacológicos reflejan la importancia que tiene esta vía de señalización durante la regeneración de la extremidad en ajolote.

Por ejemplo, el tratamiento por 8 días con “disulfiram”, un inhibidor irreversible de las aldehído deshidrogenasas⁹⁰ (ALDHs) incluyendo la RALDH2 (encargada de la oxidación de retinaldehído a RA), es capaz de inhibir la regeneración hasta en un 50% de los casos⁹¹; no obstante el fenotipo a tiempos posteriores a los 8 dpa no fue evaluado por lo que es posible que la inhibición haya sido solamente temporal. En un segundo reporte el tratamiento por 14 días con “cital”, inhibidor reversible de las ALDHs, produjo regenerados hipomórficos observados siete semanas post amputación⁹². Apoyando la teoría de que el RA es importante para que se lleve a cabo un adecuado proceso de regeneración. Contrario a dichos trabajos, nuestros resultados con los antagonistas del RARalfa y RARgamma (Ro41-5253 y CD2665 respectivamente) solos o combinados, no tuvieron un efecto significativo en la regeneración (Fig. 10A-C y 10 G-I). Lo que sugiere que la vía de señalización de RA no es necesaria durante los primeros estadios. Es posible que la inhibición de ALDHs por disulfiram y cital afecte el metabolismo de otras moléculas además del RA y esto afecte la regeneración. Por esto, los tratamientos y efectos con dichos fármacos podrían no ser comparables a los tratamientos con los antagonistas, los cuales actúan directamente a nivel del receptor.

Sin embargo, la administración de LE-135, un antagonista específico del RARbeta, si afecta la regeneración formando extremidades hipomórficas en ajolotes⁹³. No obstante, el esquema de administración fue muy distinto al nuestro; primeramente el fármaco se aplicó localmente

mediante bloques de silastina implantados proximales al sitio de amputación los cuales permanecieron durante todo el proceso de regeneración, además las concentraciones usadas eran mayores a las nuestras. Los bloques de silastina permiten una liberación gradual del fármaco a lo largo del tiempo, por lo que no es claro si los efectos de LE-135 son dependientes del estadio de regeneración. Es factible que los efectos descritos sean debidos a la acción del antagonista en procesos más tardíos de los que nosotros evaluamos, dicese crecimiento del blastema y rediferenciación. Se sugiere que durante estos estadios la regeneración se asemeja más al desarrollo embrionario de la extremidad⁹⁴, de hecho, los fenotipos hipomórficos por LE-135 se asemejan a los obtenidos en ratones KO's de RDH y RALDH⁹⁵⁻⁹⁶ y en embriones tratados con disulfiram o BMS-189453, un antagonista de pan-RARs⁹⁷. Los fenotipos con LE-135 no pueden ser atribuidos a un efecto específico al antagonizar a RARbeta ya que CD2665 también lo antagoniza, aunque en menor medida con respecto al RARgamma. Sería importante probar LE-135 bajo el esquema de administración que nosotros usamos así como probar los tres antagonistas durante estadios posteriores para rectificar si los efectos reportados anteriormente son estadio o fármaco específicos. Otra diferencia importante entre el presente trabajo y el reporte con LE-135 radica en que en dicho trabajo se estudiaron las extremidades anteriores mientras que nosotros las posteriores. Una interesante posibilidad es que exista un requerimiento diferencial a RA en las extremidades anteriores y posteriores durante la regeneración. Este sí parece ser el caso en el desarrollo de las extremidades de ratón, donde la abolición de la señalización de RA mediante el KO de RDH10 afecta importantemente el desarrollo de las extremidades anteriores pero no las posteriores⁹⁸. Durante el desarrollo del ajolote, las extremidades anteriores muestran una activa señalización de RA detectada con un reportero GFP mientras que las posteriores no⁹⁹. Esto sugiere que el requerimiento de RA para el adecuado desarrollo de las extremidades anteriores pero no posteriores está conservado en vertebrados, y éste podría ser también cierto en la regeneración. Un estudio comparativo usando los tres antagonistas durante la regeneración de extremidades posteriores y anteriores podría explicar la disparidad de nuestros resultados con los reportes previos.

RA no re-especifica los valores posicionales del eje próximo-distal en condiciones normales

La inducción de dPD sugiere que RA participa en la re-especificación de los valores posicionales de las células que formarán la nueva extremidad, estableciendo los valores para las estructuras más proximales. Una implicación de esta hipótesis es que el bloquear la señalización afectaría la

formación de las estructuras proximales del regenerado, tibia-fíbula o tarsos en amputaciones proximales o distales respectivamente. Sin embargo no pudimos observar ninguna alteración en los tratamientos con los antagonistas del RARalfa y/o RARgamma (Ro41-5253 y CD2665) en dichas estructuras (Fig. 10A-C y G-I). Dos posibles teorías pueden explicar estas discrepancias:

1) Los valores posicionales se re-especifican en etapas más tardías que las abarcadas en los tratamientos. Nuestros tratamientos abarcaron los primeros 6 dpa, estos tiempos en controles con DMSO y experimentales con Ro41-5253 y/o CD2665 incluían normalmente los primeros estadios; cerrado de herida, desdiferenciación y hasta el blastema temprano o blastema medio, en amputaciones proximales o distales respectivamente. Esta primera explicación implicaría que los valores posicionales del eje próximo-distal del blastema no se comienzan a re-especificar hasta después del blastema medio. Esta explicación es poco probable ya que evidencia experimental demuestra que las células adquieren su identidad posicional con respecto al eje próximo-distal en estadios muy tempranos. Blastemas tempranos proximales trasplantados a muñones distales son capaces de formar todas las estructuras proximales que formarían de acuerdo a su nivel de origen¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Lo que sugiere que desde el blastema temprano ya se han reestablecido los valores posicionales del eje próximo-distal. Esto fue recientemente confirmado marcando células distales y proximales de blastemas tempranos con distintos reporteros fluorescentes siguiendo su destino al final de la regeneración, mostrando que las células distales del blastema únicamente participan en la formación del autópedo mientras que las células proximales del zeugópodo¹⁰². Esto implica que la re-especificación de los valores posicionales ocurre en estadios anteriores al establecimiento del blastema. Acorde a esto, marcadores moleculares de los presuntivos dominios que formarán el estilópodo (*hoxd10*), zeugópodo (*hoxd11*) y autópedo (*hoxa13*) se comienzan a expresar antes del establecimiento del blastema¹⁰³⁻¹⁰⁴.

2) Los valores posicionales no requieren activamente de RA para su re-especificación. Esta noción es apoyada por un trabajo reciente donde observan la señalización activa de RA mediante un reportero GFP durante la regeneración. A pesar de que hay una notable expresión de GFP en el epitelio de herida, no se logró detectar señal en el mesénquima, donde residen los valores posicionales, en ningún estadio de regeneración; sin embargo, el tratamiento con RA induce fuertemente la expresión de GFP en el mesénquima⁹⁹. Esto sugiere que el mesénquima es capaz de re-especificar los valores posicionales independientemente y, no obstante, sigue siendo responsivo a la actividad proximalizante de RA.

El hecho de que RA no se requiera directamente en la regeneración implica que los niveles endógenos de RA deben ser cuidadosamente regulados para evitar sus efectos teratogénicos. Nuestros resultados al incrementar los niveles endógenos de RA con el inhibidor de la CYP26, R115866 (Fig. 10D, J y Tabla 5), apoyan esta idea, aunque no es claro si los efectos fueron resultados de una desregulación de la degradación local de RA o resultado de un incremento sistémico general. Diversos retinoides se han detectado en blastemas⁶² y se ha probado que el epitelio de herida sintetiza activamente 9-cis-RA⁶³, asimismo, el gene *cyp26b* es altamente expresado en blastemas de renacuajos de *Xenopus*¹⁰⁵. Esto implica que existe un activo metabolismo de retinoides en el blastema, por lo que es probable que los efectos con el R115866 sean debidos a una desregulación local de los niveles de retinoides.

Posible función de RA regulando la remodelación de la membrana basal

Monaghan y Maden observaron que la señalización por RA en el epitelio de herida es activa desde el dpa3 hasta el estadio de paleta⁹⁹. Esta actividad se sobrepone en espacio y tiempo con la remodelación de la membrana basal. Durante estos estadios, la formación de la membrana basal bajo el epitelio de herida es prevenida, permitiendo la comunicación entre el epitelio y las células del blastema. La pérdida de esta comunicación inhibe la regeneración⁸⁵. Se cree que la remodelación de la membrana basal depende del balance de la actividad enzimática de metaloproteinasas de matriz, como la MMP9^{87, 106-107}, mediante la expresión de sus inhibidores naturales como TIMP1¹⁰⁸. La inhibición generalizada de MMPs con fármacos también inhibe la regeneración⁸⁶ y una inadecuada expresión de estas proteínas se asocia a una regeneración deficiente¹⁰⁹. Tratamientos con RA inhiben la actividad de MMP9 mediante la sobreexpresión de TIMP1 en líneas celulares de cáncer¹¹⁰⁻¹¹¹.

Igualmente, es factible que RA sea un factor importante para regular la actividad de las MMPs mediante la expresión de TIMPs durante la remodelación de la membrana basal en la regeneración. Un exceso de RA podría llevar a una sobreexpresión de TIMPs que afectaría la remodelación favoreciendo la deposición de la membrana basal e inhibir la regeneración. Nuestros resultados apoyan esta noción; los tratamientos con los agonistas del RARalfa, RARgama (AM580 y CD1530) y el inhibidor de la CYP26 (R115866), a concentraciones altas, inhibieron la regeneración de manera similar a los reportados con el inhibidor de las MMPs⁸⁶ (Fig. 7, Tablas 3 y 5) y este fenotipo se asoció a la formación temprana de una membrana basal en los tratamientos con el agonista del RARalfa (AM580) (Fig 80 y Tabla 4). Para apoyar más esta hipótesis, sería necesario

determinar si con nuestros tratamientos hay un incremento en la expresión de TIMP1 y si se correlaciona a una menor actividad enzimática de las MMPs mediante un ensayo zimográfico de gelatina.

Nuestros resultados también mostraron un incremento en la expresión de MMP9 (Fig. 8 y Tabla 4). Esto se contrapone a reportes previos donde palmitato de retinol reduce la expresión de MMP9 a las 18 horas post-amputación⁸⁷. El incremento en la expresión de MMP9 lo observamos únicamente en muñones que mostraban una membrana basal y no en los otros tratados o controles, por lo que este efecto no es atribuible al tratamiento con el agonista AM580 per se. Hipotetizamos que la sobreexpresión de MMP9 podría ser una respuesta de las células por la presencia de la membrana basal, para intentar continuar la remodelación y continuar la regeneración. En caso de que el incremento de MMP9 pueda contrarrestar la deposición de la membrana basal, causada por los tratamientos, la regeneración podría continuar. En caso de que la deposición no pueda contrarrestarse, la regeneración se podría inhibir totalmente por la falta de comunicación entre el epitelio de herida y el mesénquima. Esto explicaría por qué sólo se inhibe la regeneración en una fracción de todos los casos con tratamientos (Tablas 3-6).

Funciones específicas de los RARs:

Trabajos con ratones KO's para distintas isoformas de los RARs y RXRs han probado que los distintos receptores tienen algunas funciones específicas, sin embargo, también comparten una extensa redundancia funcional^{69, 81}. En el tritón *Notophthalmus viridescens* se han relacionado la activación de distintas isoformas a funciones específicas, llámense inhibición del crecimiento celular *in vitro* por RARalfa1, maduración del epitelio de herida por RARgama1 y modificación de la identidad posicional por RARgama2⁸²⁻⁸⁴. No obstante, hasta ahora no se había evaluado si la activación individual de los distintos receptores podría producir fenotipos diferentes durante la regeneración *in vivo* en *Ambystoma mexicanum*, como resultado de las probables funciones específicas de dichos receptores.

Nuestros resultados con los agonistas de los RARalfa y RARgama (Am580 y CD1530) no mostraron diferencias importantes. Posiblemente estos tratamientos fueron inespecíficos bajo estas condiciones ya que el inhibidor de la CYP26 (R115866) en combinación con los antagonistas de RARalfa y RARgama (R041-5253 y CD2665) si produjeron fenotipos distintos, apoyando la hipótesis de que los receptores tienen funciones distintas durante la regeneración de la extremidad en urodelos.

RARgama durante la regeneración de la extremidad

Retraso en la regeneración: Durante la exposición de RA exógeno, el proceso de regeneración se detiene y únicamente puede proseguir una vez que la administración termina. Este retraso se le ha atribuido a la capacidad del RA de inhibir la proliferación celular⁴⁹. RA inhibe la proliferación en diversas líneas celulares de cáncer mediante la sobreexpresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKi) como p21 y p27¹¹²⁻¹¹⁵, éste podría ser el mismo mecanismo por el cual el RA inhibe la proliferación celular en la regeneración.

Al igual que con RA, nuestros resultados con los agonistas de los RARs y el inhibidor de la CYP26 produjeron un retraso significativo de la regeneración comparado con los antagonistas y el vehículo DMSO (Fig. 5 y 9). Los análisis histológicos mostraron que el tratamiento con el agonista del RARalfa (Am580) no inhibió la desdiferenciación y acumulación celular abajo del epitelio de herida (Fig. 8C y K) por lo que es más probable que la inhibición de la proliferación de estas células sea la razón del retraso. La combinación del inhibidor de la CYP26 (R115866) con el antagonista del RARgama (CD2665) no retrasó la regeneración (Fig. 9) y no así con el antagonista del RARalfa (Ro41-5253), sugiriendo que RARgama es el responsable de retrasar la regeneración cuando hay un exceso de ligando. Curiosamente, la capacidad de inhibir la proliferación celular *in vitro* se la ha asociado a RARalfa en células de blastema de tritón⁸² y de cáncer¹¹⁶⁻¹¹⁸. Sería interesante determinar si el retraso por el tratamiento con el inhibidor de la CYP26 (R115866) se debe realmente a una inhibición de la proliferación celular por la sobreexpresión de p21 y/o p27 y si el antagonista del RARgama (CD2665) y no del RARalfa (Ro41-5253) puede restaurar los niveles normales de estas proteínas y de la proliferación celular. Los tratamientos con el agonista de pan-RXR (DHA) también retrasaron la regeneración (Fig. 11A y F), aunque no tan marcadamente como con el inhibidor de la CYP26 (R115866) o con los agonistas del RARalfa y RARgama (CD1530 y Am580), sugiriendo que la actividad de los RXRs es parcialmente responsable del retraso. La activa participación de los RXRs se relaciona con la actividad de los RARs para inhibir la proliferación de células de leucemia¹¹⁹. Esto podría significar que el retraso en la regeneración de la extremidad, por los tratamientos con retinoides, es causado por la inhibición de la proliferación celular debida a la actividad del heterodímero RARgama-RXR. Particularmente, el arresto del crecimiento *in vitro* de células de carcinoma embrionario de ratón es debido al heterodímero RARgama-RXRalfa¹²⁰.

Proximalización de la información posicional: La formación de dPD sugiere que RA proximaliza la identidad posicional. En apoyo a esto, RA incrementa la expresión de marcadores proximales

como Meis y Hoxd10^{61, 121} y reduce la expresión de marcadores distales como Hoxa13¹⁰³ durante la regeneración. La actividad proximalizadora de RA se le atribuye al RARgama2⁸⁴, pues su activación induce la traslocación de las células a sitios más proximales. Esta traslocación es replicada con la sobreexpresión de Meis⁶¹ o de Prod1¹⁰². Prod1 es una proteína de superficie única en urodelos que se expresa en un gradiente de próximo a distal en la extremidad⁴³⁻⁴⁶, su expresión es directamente regulada por Meis⁴⁷ y ésta se incrementa por los tratamientos con RA⁴⁴. Las proteínas Meis son factores transcripcionales regulados por RARgama¹²², importantes para el establecimiento de patrones del eje proximodistal en el desarrollo de la extremidad⁵⁶. La traslocación de células a sitios proximales, por la actividad del eje RARgama-Meis-Prod1, indica que RARgama es responsable de la actividad proximalizadora de RA. No obstante, no se había relacionado la actividad específica de este receptor al fenotipo de dPD.

En nuestros resultados, la formación de dPD era prevenida únicamente con el antagonista del RARgama, CD2665 (Fig. 10F y L), confirmando los trabajos previos en tritón y la idea de que el RARgama es el responsable de la actividad proximalizante de RA. Sería importante confirmar, con nuestros tratamientos, si el RARgama también afecta directamente la expresión de Meis, Hoxd10, Hoxa13 y Prod1.

Morfogénesis de los dígitos: Los tratamientos con el antagonista del RARgama (CD2665) produjeron reproduciblemente sindactilias en los dígitos III-IV (Fig. 10B) lo que sugiere que el RARgama tiene un papel en la morfogénesis de los dígitos durante la regeneración de la extremidad. Las sindactilias obtenidas con CD2665 se asemejan a sindactilias tipo I-b, I-c y II-a, según el sistema Temtamy-McKusick¹²³, las cuales se caracterizan por presentar fusiones óseas entre los dedos 3-4. La sindactilia tipo I-b se relaciona con modificaciones en el cromosoma humano 2q34-q36 y se considera al gene de indian hedgehog (IHH) como un candidato responsable de esta malformación¹²⁴. La sindactilia tipo II-a se produce por mutaciones en el gene de HOXD13¹²⁵; estas mutaciones alteran la señalización por RA reduciendo directamente la expresión de Raldh2 y en consecuencia disminuyendo los niveles endógenos de RA así como la expresión de genes blanco del RA, la actividad menguada del RA favorece la condrogénesis aún en interdígitos lo que produce las fusiones (sindactilias) y dedos ectópicos (polidactilias)¹²⁶. Nuestros tratamientos con el antagonista del RARgama (CD2665) podrían estar replicando los efectos de las mutaciones en HOXD13 en las sindactilias tipo II-a, donde hay una menor señalización de RA, afectando la condrogénesis de los dígitos durante la regeneración. Ya se le ha

sugerido directamente al RARgama un papel antagónico a la condrogénesis, mediante la expresión del inhibidor de la condrogénesis *Mgp* durante el desarrollo de la extremidad de ratón^{122, 127}. La condrogénesis en los dígitos ocurre después del blastema tardío y nuestros tratamientos abarcaban hasta el blastema temprano/medio, por lo que una afectación directa de la condrogénesis parece improbable. No obstante una afectación de los progenitores de cartílago, reclutados durante la formación del blastema, podría dar lugar a alteraciones a largo plazo en la condrogénesis.

Nuestros resultados sugieren que RARgama tiene un papel importante para la morfogénesis del autómodo, posiblemente al regular los progenitores condrogénicos de los dígitos durante la regeneración de la extremidad. Sería importante determinar si el agonista del RARgama (CD2665) afecta la expresión de las proteínas asociadas a sindactilias, de marcadores de condrogénesis como *Sox9* y anticondrogénicos como *Mgp*.

RXRs como moduladores de los RARs

La actividad de los RXRs está más relacionada con procesos metabólicos. Los RXRs pueden heterodimerizar con diversos receptores nucleares y su función depende del receptor al que se unan; receptores permisivos en los que la transactivación de un gene blanco puede ser mediada por la unión del ligando de cualquier receptor, o receptores no permisivos donde únicamente la activación del receptor que acompaña al RXR induce la transactivación; la unión con los RARs es permisiva condicional ya que la unión del ligando de los RARs es indispensable para la transactivación, pero la activación del RXR puede incrementar la intensidad de la actividad del heterodímero⁷³. Se desconoce si los RXRs tienen alguna función durante a regeneración de la extremidad, sin embargo el ligando natural de los RXRs, 9cRA, es sintetizado por el epitelio de herida⁶³ y la exposición a 9cRA exógeno induce dPD⁸⁹. Lo que sugiere que los RXRs podrían tener un papel en la regeneración y posiblemente en la actividad proximalizante de RA.

A diferencia de los reportes previos con 9cRA⁸⁹, el agonista de pan-RXRs (DHA) no produjo dPD pero sí un leve retraso en la regeneración (Fig. 11A, C, F, H y Tabla 6), por lo que la sobreactivación de los RXRs podría estar relacionada con la inhibición de la proliferación celular (discutido previamente). El tratamiento con el antagonista de pan-RXRs (UVI3003) no mostró fenotipo alguno, sin embargo, en combinación con el agonista del RARgama (CD1530) agudizó los efectos de éste agonista (Fig. 11E, E', J, J' y Tabla 6). Esto sugiere que los RXRs no son necesarios durante los primeros estadios de la regeneración de la extremidad en condiciones normales; no obstante,

durante una sobreexposición a retinoides los RXRs podrían regular la intensidad de la actividad de los RARs.

Estudios *in vitro* muestran que la activación de los RXRs es capaz de regular a los receptores acompañantes, incluidos RARs, mediante su degradación¹²⁸⁻¹²⁹ o su traslocación al citoplasma¹³⁰. En cualquier caso, el resultado es una menor actividad transcripcional del heterodímero. De acuerdo a esto, durante la sobreexposición a retinoides, los RXRs podrían regular la actividad nuclear de los RARs mediante su degradación o exportación al citoplasma al ser activados endógenamente por el ligando 9cRA, sintetizado en el epitelio de herida. Al antagonizar los RXRs, los RARs se estabilizarían en el núcleo, y ya que no requiere de la actividad del RXR para la transactivación de sus genes blanco, la actividad transcripcional de los RARs se incrementaría agudizando sus efectos. Para probar esta teoría sería necesario visualizar la localización de RARs y RXRs en la célula usando anticuerpos específicos fluorescentes, así como la integridad de estas proteínas mediante western blot, durante los tratamientos con el antagonista de RXRs (UVI3003) y el agonista del RARgama (CD1530).

Modelo teórico para el establecimiento de patrones explica los fenotipos por RA

Modelos de límites y coordenadas polares

Experimentos clásicos con trasplantes llevaron a la formulación de dos modelos teóricos, entre las décadas 70-80, para explicar cómo se establecen los patrones durante la regeneración y desarrollo de la extremidad.

El “modelo de límites”, propuesto por Meinhardt en 1983, surge de evidencia experimental de trasplantes de zonas presuntivas del campo de la extremidad en embriones de anfibios¹³¹. Estos trabajos describen dos zonas importantes para el establecimiento del campo de la extremidad; la más prominente localizada en el flanco anterior (rostral) llamada “zona competente”, y la “zona polarizante” localizada en el flanco posterior (caudal). La formación de un gradiente morfogenético entre estos dos compartimientos establece los patrones del eje antero-posterior en el campo de la extremidad. Una segunda compartimentalización de la zona competente, se supone, establece los patrones del eje dorso-ventral, definiendo completamente así los dos ejes del campo de la extremidad. La intersección de los límites de los compartimientos delimita el punto de crecimiento hacia eje próximo-distal mediante la producción de un morfógeno. La determinación de los patrones a lo largo del eje próximo-distal depende de un gradiente distal-

proximal de este morfógeno, una mayor exposición al morfógeno determina estructuras distales mientras que una menor presencia del morfógeno produce estructuras proximales^{94, 131}. Durante la regeneración, se supone que una misma confrontación de límites de los 4 compartimientos induce la producción del morfógeno para regenerar las estructuras perdidas. El modelo de límites pudo predecir acertadamente los fenotipos obtenidos por trasplantes de blastemas, aunque, no ofrecía una explicación de la manera en que la inducción del morfógeno era regulada para seguir la “regla de la transformación distal” y solo regenerar las estructuras más distales al sitio de corte. Además, el modelo surge de evidencia obtenida durante el desarrollo y supone que trabaja igual en la regeneración, siendo la homología entre ambos procesos debatible. Por ejemplo, el modelo se sustenta en la acción de gradientes los cuales pueden funcionar en el campo de la extremidad del embrión; sin embargo en una superficie más grande, como es el muñón de un ajolote adulto, la acción de un gradiente morfogenético podría ser despreciable.

A diferencia del “modelo de límites”, que surge de evidencia durante el desarrollo y se sustenta en gradientes; el “modelo de coordenadas polares”, propuesto por French en 1976, surge con evidencia de regeneración de extremidades en insectos y vertebrados, y enfatiza las interacciones celulares para inducir el crecimiento y el establecimiento de patrones^{24, 94, 132}. En este modelo (Fig. 13A) la información posicional del campo se representa por las intersecciones de valores radiales (eje próximo-distal) con valores angulares (ejes antero-posterior y dorso-ventral). De esta manera la identidad posicional, con respecto a los 3 ejes dimensionales, contenida en una célula se representa con dos valores alfanuméricos.

La combinación de valores también determina la compatibilidad que puedan tener las células contiguas; por ejemplo, los valores contiguos **A12** y **A1** son compatibles entre sí y pueden coexistir, al igual que **A12** con **Z12** pero no así **A12** con **A4** ó **A12** con **E12**. Cuando valores no compatibles se confrontan, por ejemplo **A12-A4** o **A12-E12**, se induce un crecimiento entre estos valores para producir células que adquieran valores intermedios y recobren la armonía del campo, a este proceso se le llamó “intercalación”; así la confrontación **A12-E12** resulta en la intercalación

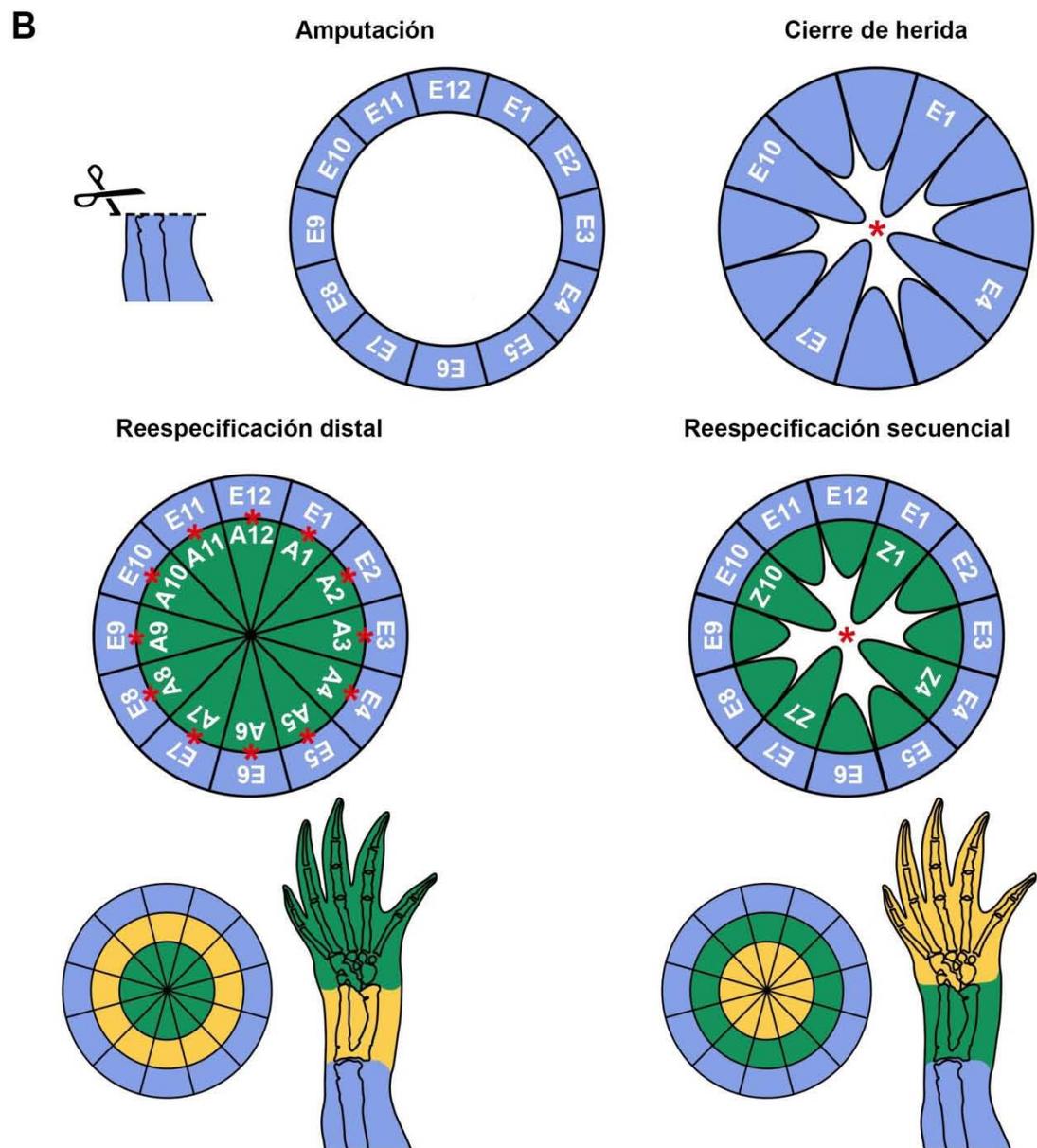
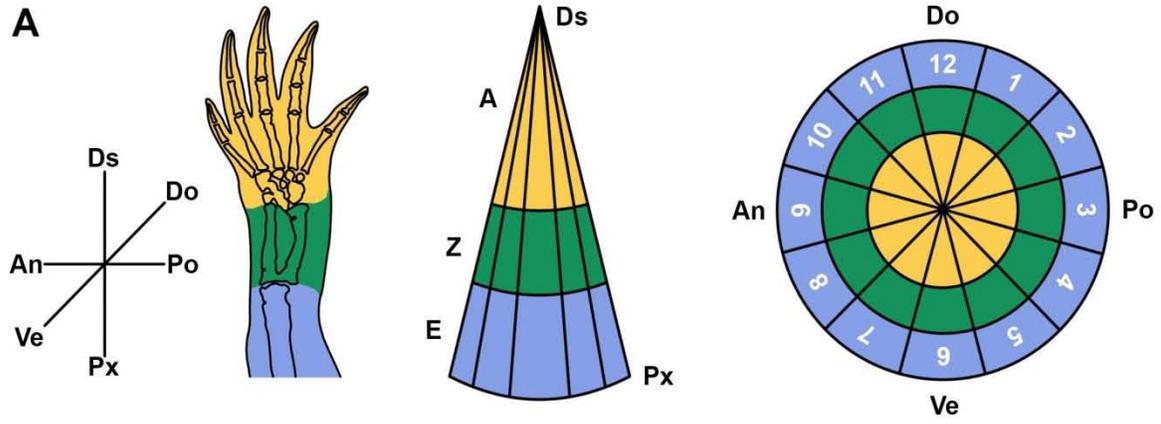


Figura 13. Modelo de coordenadas polares

Propuesto originalmente por French *et al*¹³² en 1976. **A)** La información posicional del campo de la extremidad se representa con dos valores alfanuméricos en un plano de coordenadas polares; un valor a distintos puntos del radio (valores radiales) determina la información posicional del eje próximo-distal, por simplificación solo pusimos tres valores: E (estilópodo), Z (zeugópodo) y A (autópodo); los ejes antero-posterior y dorso-ventral son representados con 12 (1-12) valores angulares repartidos simétricamente en la circunferencia. La información posicional contenida en la extremidad del ajolote se puede representar con una extensión del sistema bidimensional a un cono tridimensional. **B)** La confrontación de valores incompatibles (representada con el asterisco) en el cierre de herida de una amputación proximal induce la re-especificación de los valores faltantes mediante la distalización (e.g. E1 -> A1) y la intercalación (e.g. A1-A4 -> A1-A2-A3-A4) de los valores existentes. La re-especificación de los valores puede ser distal, es decir una distalización (E1-**A1**) seguida de una intercalación de los valores faltantes (E1-**Z1-A1**), o puede ser secuencial, una distalización (E1-**Z1**) seguida de más distalizaciones hasta completar los valores (E1-**Z1-A1**).

de los valores intermedios **A12-Z12-E12**. En el caso de que más de una posible intercalación sea posible, la “regla de la intercalación más corta” favorece la que contenga menos valores. Por ejemplo, en la confrontación **A12-A4** dos intercalaciones son posibles, **A12-A1-A2-A3-A4** y **A12-A11-A10-A9-A8-A7-A6-A5-A4**, la primera es favorecida sobre la segunda.

Durante la regeneración, el cierre de herida supondría una confrontación de valores no compatibles que provocarían crecimiento y la re-especificación de los valores perdidos para recobrar la armonía del campo. Una amputación al nivel del estilópodo provoca la confrontación de valores no compatibles (Fig. 13B asterisco) la cual lleva a la producción de células que adquieren un valor posicional más distal, para re-especificar los valores perdidos. Esta “distalización”, de acuerdo al ejemplo, puede actuar de dos formas; una primera distalización re-especifica los valores más distales (valores **A**) y la intercalación de valores intermedios (valores **Z**) completan el sistema, alternativamente una serie de distalizaciones secuenciales desde los valores confrontados hasta los valores más distales completan también el sistema, es decir una distalización a **Z** seguida de una a **A** (Fig. 13B). La evidencia experimental no favorece ninguna de las dos posibilidades y el juicio de la validez de cualquiera de las mismas va más allá del objetivo de este trabajo, por lo que ambas posibilidades se dan por válidas.

Aunque falto de un mecanismo molecular que apoye las interacciones celulares que supone, el modelo de coordenadas polares también pudo predecir la mayoría de los fenotipos obtenidos por experimentos con trasplantes y ofrece un mecanismo que explica la “regla de la transformación

distal”, a diferencia del modelo de límites. Es por esto que decidimos adoptarlo para tratar de explicar los fenotipos obtenidos con nuestros tratamientos.

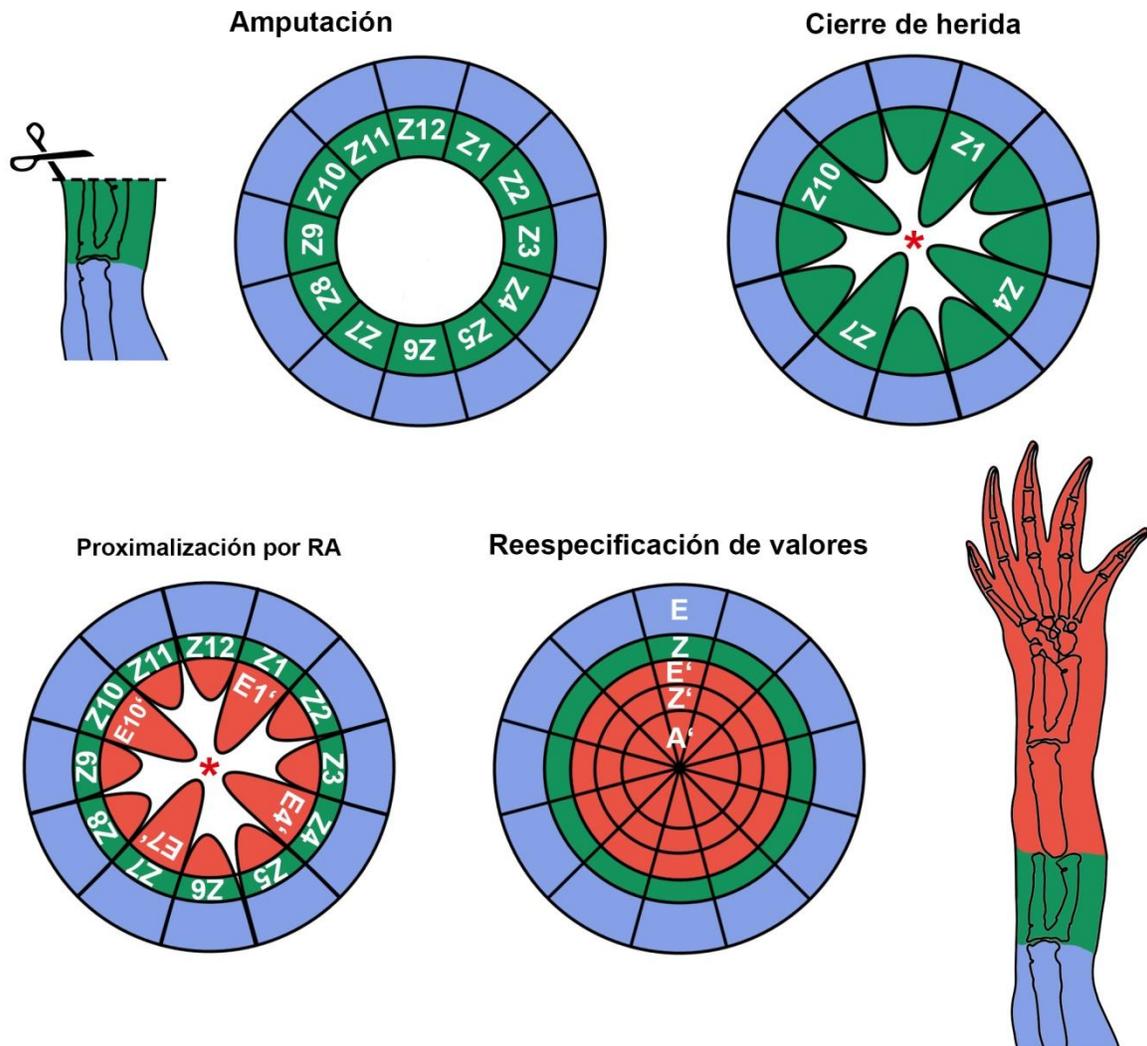


Figura 14. Proximalización de los valores radiales por RA.

Acorde al modelo, el exceso de RA afectaría a las células que re-especifican los valores radiales durante la confrontación del cierre de herida, dándoles una identidad más proximal (representado con el tilde), en el ejemplo los valores Z generan E' en lugar de A. La confrontación de los nuevos valores E' prosigue con la ditalización hasta completar el sistema (Fig. 13) y producir las dPD.

dPD en el modelo de coordenadas polares

La inducción de dPD por RA sólo ocurre cuando los tratamientos se administran dentro de una ventana temporal que abarca desde la desdiferenciación hasta el blastema medio⁴⁹. Evidencia con trasplantes de blastemas a distintos tiempos muestran que para el blastema medio la información posicional ya se ha re-especificado irreversiblemente¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Esto sugiere que RA únicamente puede

ejercer su efecto proximalizante mientras el mecanismo de re-especificación de valores está encendido y una vez que todos los valores se han recuperado este mecanismo se apaga y RA no puede modificar la información posicional.

En términos del modelo de coordenadas polares, esta ventana temporal se representa por las series de distalizaciones/intercalaciones que ocurren para re-especificar los valores perdidos (Fig. 13B). El tratamiento con RA incluiría un paso anómalo en el proceso (Fig. 14), una “proximalización” de los valores radiales **Z** a **E'** en lugar de la “distalización” a los valores **A**. La re-especificación de los valores más distales al nuevo valor radial dado por RA (**E'**) se daría como en una amputación normal (Fig. 13B). Ya que los valores **Z** y **E'** siguen siendo compatibles la configuración final **E-Z-E'-Z'-A'** no se entiende como una anomalía en el sistema y es tolerada. El resultado de esta nueva configuración se traduce en la formación de las dPD.

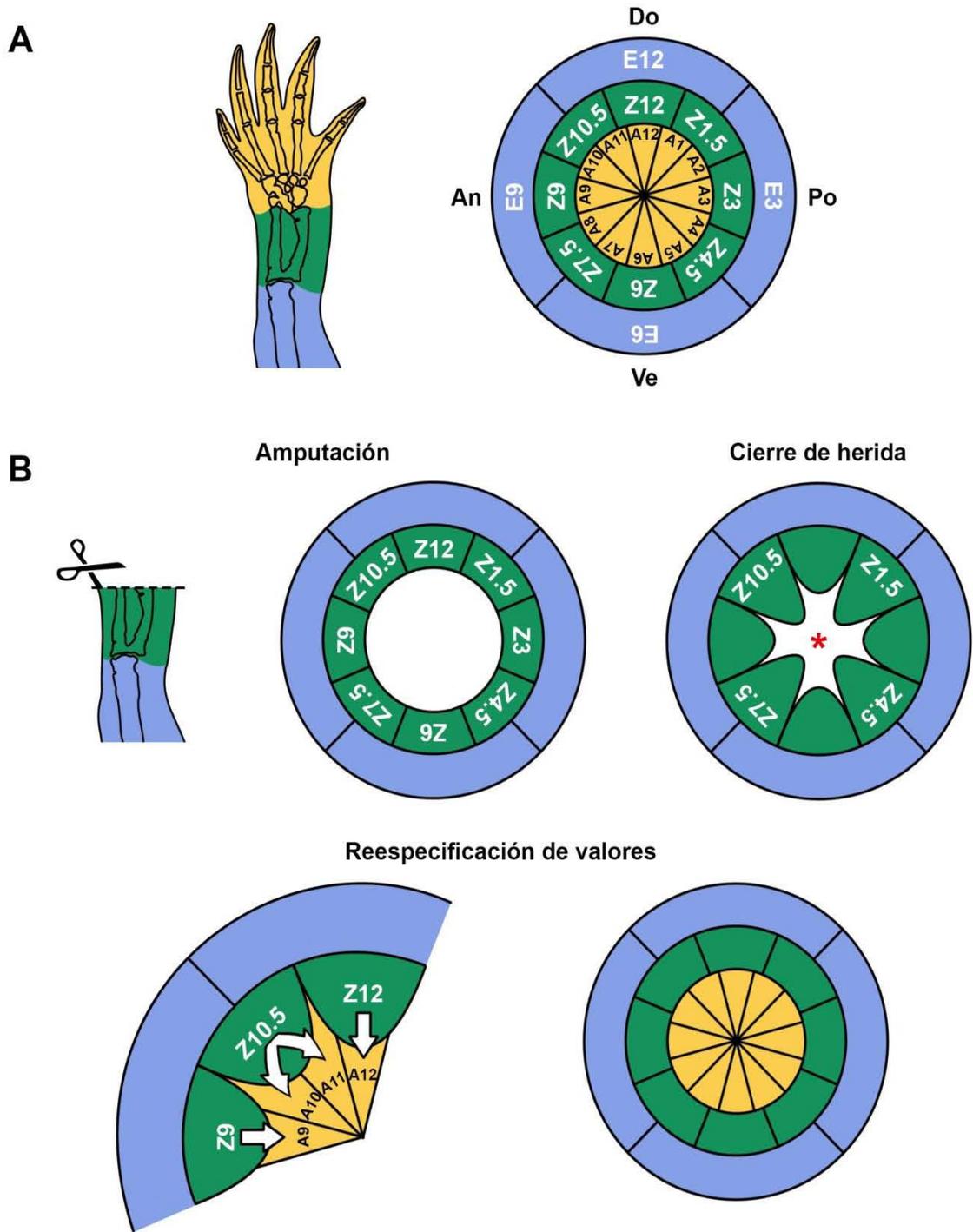
El modelo de coordenadas polares clásico no explica la preferencia a amputaciones proximales de las duplicaciones especulares

Además de la proximalización de valores posicionales a lo largo del eje próximo-distal, nuestros tratamientos pudieron afectar la información posicional en los ejes antero-posterior y dorso-ventral dando como resultado duplicaciones especulares (Fig. 12). Las duplicaciones especulares por exposición a RA son comunes en anuros, aves e incluso mamíferos^{54-55, 133-136} pero son rara vez vistas en urodelos¹³⁷⁻¹³⁸.

En nuestros resultados, la incidencia de estos fenotipos no se asoció a algún fármaco o concentración particular y ocurría en raras ocasiones, no obstante, todos los casos se dieron en amputaciones proximales y jamás se observaron en amputaciones distales. Un único caso regeneró una estructura ectópica (Fig. 6E flecha), sin embargo, por su morfología, no pudimos determinar si ésta realmente representaba una duplicación especular y fue omitida. Curiosamente, Ju *et al*¹³⁸ también observó una mayor proporción de duplicaciones especulares en amputaciones proximales contra distales.

Esta preferencia de las duplicaciones especulares a amputaciones proximales indica que en las células hay una sensibilidad diferente a RA, para alterar la información posicional en los ejes antero-posterior y dorso-ventral, a lo largo del eje próximo-distal, siendo más sensibles mientras más proximal sea la amputación. Ya que RA solamente puede proximalizar la información posicional cuando la ventana temporal de re-especificación de patrones se encuentra abierta, es factible que de la misma manera, la alteración de la información en los ejes antero-posterior y

dorso-ventral por RA ocurra únicamente cuando el mecanismo de re-especificación en estos ejes está activo. Esto implica que este mecanismo ocurre únicamente, o en mayor medida, en amputaciones proximales que en distales.



Continúa...

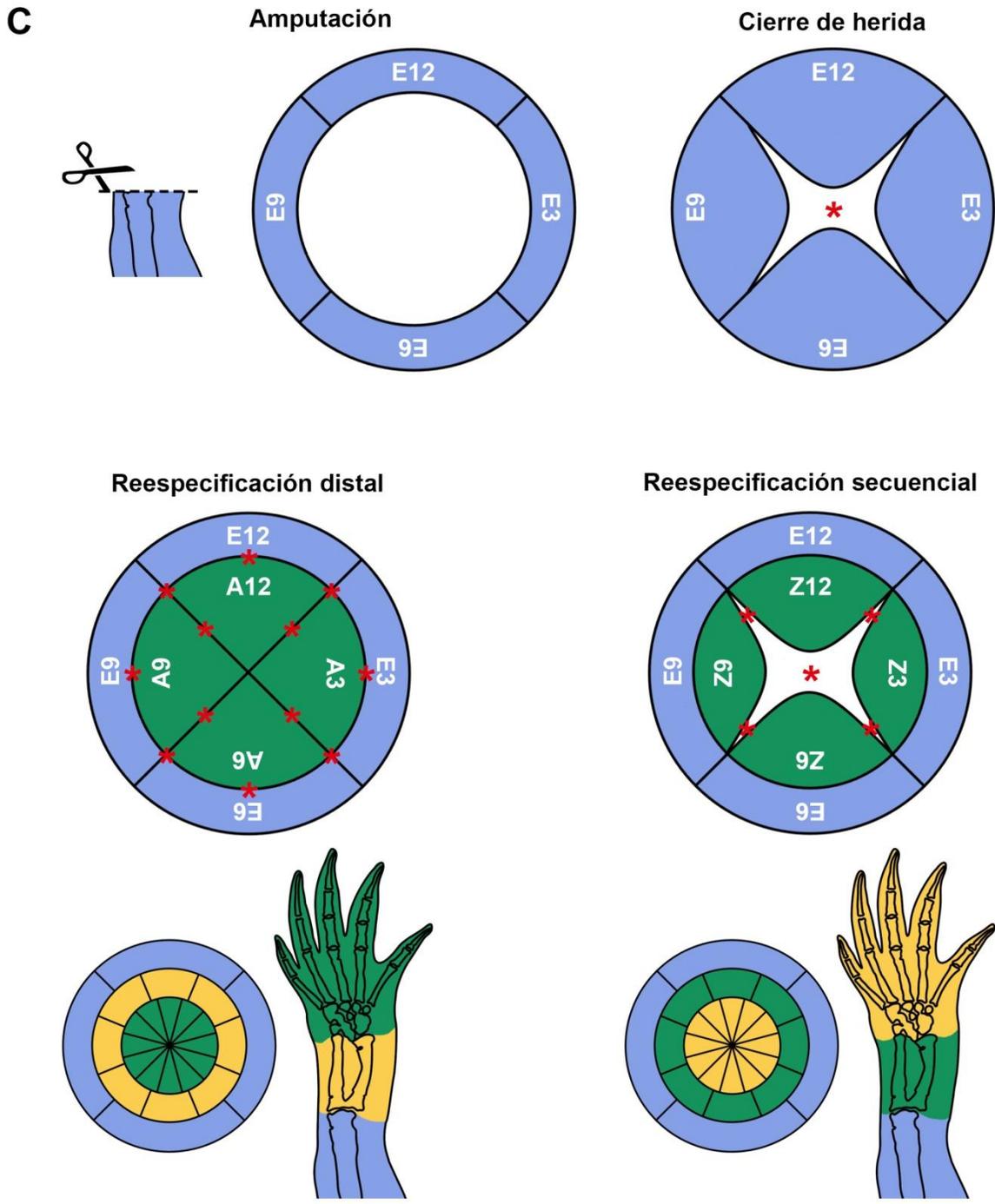


Figura 15. Modelo de coordenadas polares modificado.

A: El número de valores angulares incrementa mientras el nivel radial se acerca al centro del plano (4 valores E, 8 valores Z y 12 valores). **B:** Los valores intermedios como **Z10.5** pueden dar lugar a valores compatibles más distales como **A11** y **A10** para completar el sistema. **C:** En una amputación proximal no existe una población que pueda dar lugar a los valores intermedios por lo que tienen que ser intercalados (e. g. Z12-Z3 -> Z12-Z1.5-Z3) La re-especificación de valores restantes puede ser distal o secuencial.

El modelo clásico de coordenadas polares no explica nuestras observaciones ni las obtenidas por Ju *et al*¹³⁸. Ya que los valores angulares son constantes a lo largo del eje próximo-distal (Fig. 13A) no habría una diferencia en la re-especificación de estos valores a distintos niveles radiales, por consiguiente no debería existir una preferencia importante a algún nivel radial para la formación de duplicaciones especulares. Para acoplar el modelo a la evidencia de duplicaciones especulares sugerimos una modificación al modelo clásico para cambiar la cantidad de valores angulares dependiendo del nivel radial (Fig. 15A).

En nuestro modelo de coordenadas polares modificado asignamos arbitrariamente 4 valores angulares al nivel **E**, 8 al **Z** y 12 al **A**. Esta modificación no afecta las reglas básicas del modelo respecto a las interacciones celulares pero agrega ciertas consideraciones dependiendo del nivel radial; los valores **E3, E6, E9** y **E12** se consideran continuos y por tanto son compatibles **E3-E6, E6-E9, E9-E12** y **E12-E3** pero no así **E12-E6** ó **E3-E9**, otros valores (E1, E2, E4, E5, etc.) son innecesarios o inexistentes para completar la circunferencia; de igual manera los valores **Z1.5, Z3, Z4.5, Z6, Z7.5, Z9, Z10.5** y **Z12** completan el patrón y cualquier otro valor (Z1, Z2, Z4, Z5, etc.) es innecesario, los valores extras que surgen a este nivel mantienen una compatibilidad con los valores que los flanquean en los tres niveles, por ejemplo, **Z1.5** es compatible con **E12, E3, Z12, Z3, A1** y **A2**; el nivel **A**, al igual que el modelo clásico, incluye 12 valores angulares (**A1-A12**) que completan el patrón. Curiosamente, esta modificación podría revelar una relación entre el número de valores angulares con la complejidad morfológica de la estructura que representa. Por ejemplo, el nivel radial **E** contiene la menor cantidad de valores angulares y representa la estructura más sencilla, el estilópodo el cual incluye una sola estructura esquelética (húmero/fémur) y no tiene asimetrías notables en los ejes antero-posterior y dorso-ventral; mientras que los niveles **Z** y **A** incrementan progresivamente el número de valores angulares a la vez que incrementa el número, complejidad y asimetría de las estructuras que representa, el zeugópodo y autópedo (Fig. 15A).

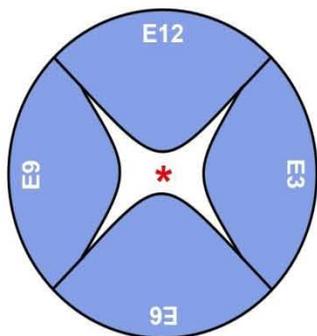
En nuestra modificación, el proceso de regeneración incluye los mismos procesos, confrontación de valores posicionales en el cierre de herida y distalización/intercalación de los valores para recobrar la armonía del sistema. La esencia de la modificación reside en el número de valores angulares con los que se cuenta dependiendo del nivel de amputación; así en una amputación distal (Fig. 15B) se tienen valores angulares intermedios (**Z1.5, Z4.5, Z7.5** y **Z10.5**) que pueden ser transmitidos para re-especificar valores compatibles durante la distalización, por ejemplo **Z10.5** puede dar origen a los valores **A11** y **A10**; mientras tanto en una amputación proximal los valores

posicionales con los que se cuenta son más limitados, los valores angulares **3, 6, 9 y 12** pueden ser transmitidos fácilmente durante la distalización pero no pueden dar lugar a valores intermedios, por lo que una mayor cantidad de valores angulares deben ser re-especificados para completar el sistema (Fig. 15C).

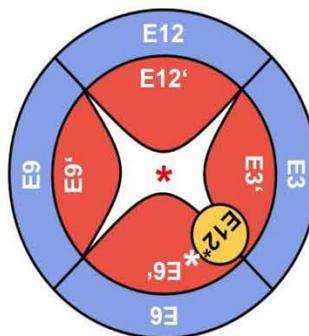
En otras palabras, éste modelo modificado implicaría que los valores posicionales de los ejes antero-posterior y dorso-ventral son diferentes a lo largo del eje próximo-distal de la extremidad. Por lo que amputaciones a distintos niveles del eje próximo-distal transmitiría al blastema información diferente de los ejes antero-posterior y dorso-ventral. Entonces, durante la regeneración, no sólo los valores posicionales del eje próximo-distal deben ser re-especificados, sino también los valores antero-posteriores y dorso-ventrales faltantes, dependiendo del nivel de amputación. Por lo que algún o algunos mecanismos deben activarse para re-especificar estos valores; éste o estos mecanismos son activados diferencialmente dependiendo de la cantidad de valores a re-especificar, determinados por el nivel de amputación. Es decir, que en amputaciones proximales, donde se transmiten una limitada cantidad de valores antero-posteriores y dorso-ventrales, algún mecanismo que reespecifique los valores perdidos se debe activar; mientras que en amputaciones distales, donde hay una transmisión de una mayor cantidad de valores posicionales, éste mecanismo no se activaría o se activaría en menor medida. Es posible que el RA, similar a como afecta el mecanismo de re-especificación de valores próximo-distales, pueda afectar el (los) mecanismo(s) de re-especificación de valores antero-posteriores y dorso-ventrales; y ya que éste (estos) se activa(n) preferente o únicamente en amputaciones proximales, el RA induciría alteraciones en éstos ejes preferentemente en amputaciones proximales, lo que explicaría la formación de duplicaciones especulares en amputaciones proximales en el presente trabajo y el de Ju *et al*¹³⁸.

Con este modelo modificado pudimos reproducir teóricamente algunos de las duplicaciones especulares más severas mediante la inserción de un valor de manera ectópica (Fig. 16 comparar con Fig. 12C-E). Ya que las duplicaciones especulares tendían a replicar preferentemente estructuras anteriores y a formar un nuevo dorso se eligió la inserción del valor **E12*** (dorsal) en el dominio postero-ventral (entre **E3'** y **E6'**); no obstante la inserción del valor anterior (**E9***) en el mismo dominio da resultados esencialmente idénticos. La inserción resulta en una confrontación de los valores incompatibles **E12*-E6'** (Fig. 16A), el desenlace de las interacciones celulares entre ambos valores puede dar como resultado dos escenarios con tres resultados finales. Primero, el

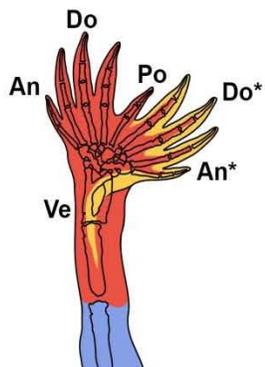
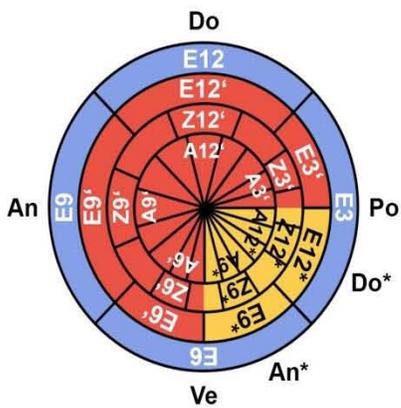
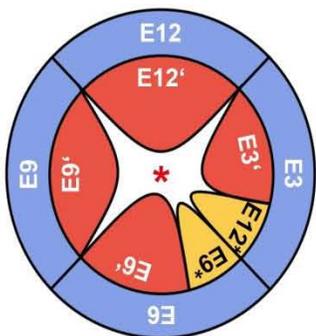
A Cierre de herida



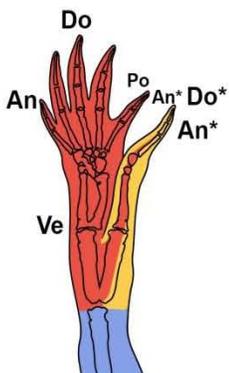
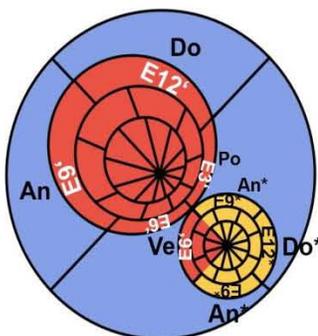
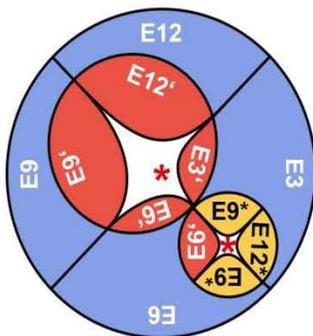
Proximalización de valores E' e inserción de E12* por RA



B Blastema con valores extras



C Blastema extra con valores anteriores



D Blastema extra

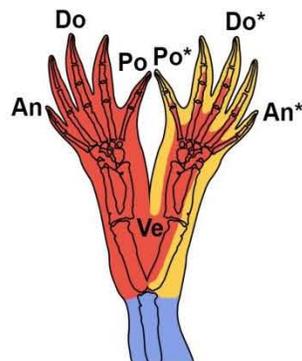
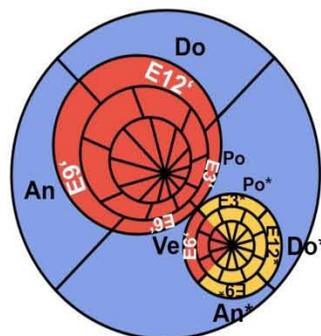
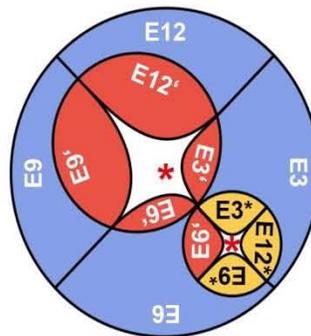


Figura 16. Inserción de un valor ectópico en el dominio postero-ventral predice las duplicaciones especulares producidas con RA.

A: El valor E12* insertado por RA interactúa con el valor incompatible E6'. **B:** si el valor se acopla al sistema e intercala el valor intermedio E9* el resultado replica los valores dorsales (Do*) y anteriores (An*) en el mismo sistema produciendo un fenotipo similar a la figura 12C. **C:** si el valor insertado produce un nuevo sistema con el valor E6' pero intercala únicamente valores anteriores (E9*) el resultado sería una extremidad hipomórfica similar al fenotipo de la figura 12D. **D:** si el nuevo sistema intercala valores anteriores (E9*) y posteriores (E3*) se formaría una extremidad completa como en la figura 12E.

valor insertado es acoplado al sistema y la incompatibilidad es resuelta mediante la intercalación del valor **E9***, el resultado final es un sistema que ha replicado los valores anteriores y dorsales (Fig. 16B) similar al fenotipo de la figura 12C. Segundo, el valor insertado forma un nuevo sistema con ayuda de las células **E6'**, la intercalación entre ambos valores puede dar dos resultados finales; si los valores intercalados solo incluyen valores anteriores **E9*** (Fig. 16C) el sistema extra únicamente formaría las estructuras anteriores (tibia y dígito I) semejante al fenotipo de la figura 12D, fenotipos similares se han obtenido en blastemas con valores posicionales incompletos construidos quirúrgicamente¹³⁹⁻¹⁴⁰; alternatively si el sistema extra intercala valores posteriores **E3*** puede completar el patrón de una extremidad completa (Fig. 16D), como el fenotipo de la figura 12E. De manera similar, se ha sugerido que la alteración de algún valor posicional particular en un grupo de células de los discos imagales de *Drosophila melanogaster* resulta en la formación de sistemas ectópicos que producen extremidades especulares¹⁴¹.

La baja incidencia de éstos fenotipos sugiere que éste es un efecto indirecto de RA y otros factores desconocidos pueden estar participando, o alternatively la inserción de valores ectópicos podría resultar de manera más común en la apoptosis de estas células como un mecanismo más sencillo para recobrar la armonía y solo en pocos casos algunas células escapan de la apoptosis y pueden interactuar con el sistema y modificarlo.

Hay poca información sobre los mecanismos moleculares que determinan los patrones en los ejes antero-posterior y dorso-ventral durante la regeneración de la extremidad de urodelos, no obstante los patrones de expresión de genes claves para los patrones durante el desarrollo sugiere que los mecanismos podrían ser muy similares. Durante el desarrollo, los patrones del eje antero-posterior dependen de la actividad del gradiente del morfógeno SHH el cual se expresa en el mesénquima del flanco posterior del primordio de la extremidad¹⁹. De manera similar, en la

regeneración SHH se expresa en el mesénquima posterior del blastema a partir del blastema medio y hasta el paleta³⁴. La determinación de los patrones del eje dorso-ventral en el desarrollo está regulada por la expresión restringida en el mesénquima dorsal de Lmx1b por la acción de Wnt7a secretada del ectodermo dorsal, el ectodermo ventral expresa En-1 el cual reprime la expresión de Wnt7a¹⁴². En la regeneración Lmx1b también se expresa en el mesénquima dorsal del blastema; sin embargo la restricción dorsal en su expresión parece ser independiente de Wnt7a, ya que éste se expresa tanto en el ectodermo dorsal como ventral¹⁴³. En los modelos de la figura 16, las alteraciones producidas por nuestros tratamientos sugieren que un grupo de células dentro del dominio postero-ventral del blastema adquieren valores posicionales anteriores (E9*) o dorsales (E12*). Esto implicaría que estas células pudieron haber modificado sus valores posicionales al reducir su expresión de SHH o al inducir la expresión de Lmx1b. Para probar dicha teoría, sería importante evaluar si hay un cambio en la expresión de ambos genes durante nuestros tratamientos.

Nuestra modificación al modelo de coordenadas polares asume que la re-especificación de patrones en los ejes antero-posterior y dorso-ventral es diferente dependiendo del nivel de amputación en el eje próximo-distal. Dicha hipótesis requiere sustento experimental, un estudio combinando los experimentos clásicos de trasplantes y confrontación de valores posicionales con técnicas modernas de marcaje celular podría dar el sustento experimental para esta modificación al modelo de coordenadas polares.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo abordó la pregunta ¿tienen los distintos RARs diversas funciones durante la regeneración de la extremidad, incluida la regulación del campo morfogénico y la formación de patrones? Haciendo uso de una batería de fármacos para activar o inactivar específicamente los dos subtipos de RARs reportados previamente, pudimos obtener distintos fenotipos como duplicaciones próximo-distales, inhibición de la regeneración, retraso de la regeneración, sindactilias y duplicaciones especulares. Particularmente el retraso de la regeneración, las duplicaciones próximo-distales y las sindactilias son atribuidas al RAR γ ; mientras que no se le pudo atribuir algún fenotipo específico al RAR α . Así mismo la inhibición de la regeneración y las duplicaciones especulares no se pudieron atribuir a algún RAR particular. Con nuestros resultados podemos sugerir que el RAR γ es responsable de modificar la información posicional del campo

cuando es sobre-activado lo que produce las duplicaciones próximo-distales; también parece tener una función antes desconocida en la morfogénesis de los dígitos III y IV ya que antagonizarlo produce sindactilias en dichos dígitos. Por otro lado el RARalfa podría no tener ninguna función particular o ser redundante con las del RARgamma. Este trabajo permite el planeamiento de experimentos futuros que lleven a entender concretamente las funciones que desempeñan estos receptores y la señalización por RA; en la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum*, en la regulación de su campo morfogenético y su consecuente formación de patrones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fármacos y reactivos

Am580 y Ro41-5253 fueron comprados a BioMol® (Enzo® life sciences. New York, USA), mientras que CD1530 y CD2665 a Tocris bioscience (Bristol, UK). R115866 fue una donación de Jean Van Wauwe (Johnson & Johnson. New Jersey, USA). Todos los fármacos eran conservados en alícuotas de 10 ul a una concentración de 50 mM a -20 °C. Alícuotas con concentraciones de 25, 12.5 o 5 mM se prepararon al momento de realizar los tratamientos. Todos los reactivos se compraron a JT. Baker® (Avantor™. Pennsylvania, USA), Merck (New Jersey, USA) y Sigma-Aldrich® (Missouri, USA) a menos de que se especifique distinto.

Cuidado, cirugía y tratamientos

Los ajolotes (*A. mexicanum*) eran obtenidos en huevo. Una vez eclosionados, los animales se colocaban en una sola pecera de 10 L con aireación constante y se les alimentaba diario con nauplios de artemia hasta que llegaran a los dos centímetros de longitud, después eran colocados individualmente en recipientes de plástico con ~150 mL de agua corriente filtrada, la cual se cambiaba semanalmente, y eran alimentados diario con artemia. La artemia y los quistes de artemia eran obtenidos con comerciantes locales.

Únicamente se operaron animales de 4 a un máximo de 6 cm. Los animales era sumergidos en agua filtrada con 0.05 % (p/v) de “tricaina” (sal de etil 3-aminobenzoato metanosulfonato) hasta que no respondieran a estímulos mecánicos y eran colocados en cajas de Petri con una esponja humedecida con agua filtrada y azul de metileno (concentraciones recomendadas por el proveedor “AZUL”). Las amputaciones proximales se realizaron en las extremidades posteriores derechas a la altura del estilópodo en la región distal, justo proximal a la articulación de la rodilla, mientras que las amputaciones distales se realizaron en las extremidades posteriores izquierdas a

la altura del zeugópodo en la región distal, proximal al inicio de los dígitos. Las operaciones se realizaron con tijeras y pinzas de microcirugía, cuando era necesario se recortaba el hueso protruyente con microtijeras para asegurar una superficie plana en el muñón. Después de la cirugía, se les dejaba reposar por 20 min en su recipiente individual, inmediatamente después eran cambiados a agua filtrada limpia con distintas concentraciones de los fármacos usados preparada al momento. El agua con los fármacos era recambiada al dpa2 y al dpa4, para el dpa6 se les colocaba únicamente agua limpia. Durante el curso del tratamiento se colocaban los recipientes en obscuridad para evitar la fotoisomerización de los fármacos.

Monitoreo de la regeneración

Después del tratamiento, se tomaron micrografías de las extremidades en regeneración cada segundo día. Para esto, los ajolotes fueron anestesiados con tricaina y puestos en una caja de Petri con agua filtrada; las fotos fueron tomadas con una cámara (AxioCam MRc Zeiss. Oberkochen, Alemania) conectada a un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500. Tokio, Japón). El seguimiento se hizo hasta que las extremidades llegaran al estadio de crecimiento de dígitos (CD) o hasta el dpa50.

Tinción de esqueleto

Al dpa50, las extremidades regeneradas eran reamputadas en la región del estilópodo proximal y se deshidrataron sumergiéndolas en 96 % de etanol durante 24 h. Después se permearon con acetona por 24 a 48 h y tiñeron luego con la mezcla de 0.015 % (p/v) de azul alciano y 0.005 % (p/v) de rojo de alizarina en 70 % de etanol y 5 % de ácido acético durante 24 a 48 h. El tejido blando se transparentó sumergiendo las extremidades en 20 % (v/v) de glicerol con 1 % (p/v) de KOH. Posteriormente se les tomaban micrografías.

Histología

Blastemas o muñones eran reamputados en la región del estilópodo proximal y eran fijados con 4% (p/v) de paraformaldehído y 0.6 mM de NaOH en buffer de fosfatos "PBS" (0.8 % (p/v) NaCl, 0.02 % (p/v) KCl, 0.144 % (p/v) Na₂HPO₄, 0.024 % (p/v) KH₂PO₄, pH7.4) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, el tejido era deshidratado con un tren de concentraciones crecientes (25-50-75-100 %) de metanol en PBS con 0.1 % de Tween-20 y almacenado a -20 °C. El tejido era luego lavado dos veces con xilol por 15 min a temperatura ambiente y colocado en un vial con xilol y parafina paraplast derretida (1:1) a 55 °C toda la noche. Al día siguiente el tejido se lavó dos veces con puro paraplast a 55°C por 1 h, después era colocado en bloques de parafina y se almacenaron

a -20 °C. Se les realizaron cortes de 10 um con un micrótopo (Leica RM2235. Wetzlar, Alemania) y se colocaron en laminillas tratadas con TESPA sobre una plancha a 37 °C durante toda la noche, posteriormente las laminillas era almacenadas a 4 °C. Las laminillas se prepararon con lavandos de 1 min a temperatura ambiente de 10 % HCl en 70 % de etanol, agua desionizada, etanol 96 %, TESPA 4 % en acetona, dos más de acetona y tres de agua desionizada.

Tinción trocrómica de Masson: las laminillas eran desparafinadas sobre una plancha a 60 °C durante 1 h, lavadas durante 10 min con xilol a temperatura ambiente dos veces y rehidratadas con un tren de concentraciones decrecientes de etanol (100-96-90-85-75-50-25-0 %) con agua destilada, también a temperatura ambiente. Posteriormente se fijaron los cortes en la solución de Bouin (71.4 % ácido pícrico 9.5 % formaldehido y 4.7 % ácido acético glacial) durante 1 h a 56 °C, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con agua destilada. Todos los lavados y tinciones se realizaron a temperatura ambiente; se sumergieron los cortes en la solución de Weigert (0.5 % (p/v) hematoxilina, 0.58 % (p/v) FeCl₃, 0.5 % HCl y 47.5 % etanol) durante 10 min y se lavaron con agua destilada dos veces; se sumergieron en la solución de Briebrich (0.9 % [p/v] escarlata de Biebrich, 0.1 % [p/v] fucsina ácida y 1 % ácido acético glacial) por 10 min, se lavaron dos veces con agua y se dejaron en 2.5 % (p/v) de ácido fosfotúngstico y 2.5 % (p/v) de ácido fosfomolibdico por aproximadamente 1 h o hasta que el cartílago dejara de verse rojo; se tiñeron finalmente con azul de anilina (2.45 % (p/v) azul de anilina y 1.96 % ácido acético glacial) por 20 min y se volvieron a lavar con agua dos veces y una última vez con 1 % de ácido acético por 5 min. Después, se deshidrataron los cortes pasándolos rápidamente por 95 % de etanol, 100% de etanol y luego xilol. Las laminillas se montaron con un cubreobjetos usando cyto seal (Thermo scientific. Massachusetts, USA) y se almacenaron a temperatura ambiente. Se les tomaron fotos a las laminillas en el microscopio.

Hibridación in situ: Todos los lavados se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique algo más. Las laminillas eran desparafinadas en la plancha por 1 h a 60 °C y lavados por 5 min con xilol dos veces. Se rehidrataron con un tren de metanoles (100-75-50-25-0 %) de 5 min con PBS-tween-20 (0.1 %) y se fijaron con paraformaldehido-NaOH-PBS por 15 min. Se lavaron por un minuto con PBS-tween-20 tres veces y se permeó el tejido con 10 ug/ml de proteinasa K en PBS-tween-20 por 15 min. Se lavaron durante 5 min con 2 mg/ml de glicina en PBS-tween-20 y tres veces más con únicamente PBS-tween-20. Se volvieron a fijar con paraformaldehido-NaOH-PBS por 20 min, se colocaron en 0.25 % de ácido anhídrido y 0.1 M de trietanolamina por 10 min y se

lavaron con PBS-tween-20 por 5 min dos veces. Las laminillas se colocaron en una cámara humedecida con la solución 1 (50 % formamida, 20 % SSC 20X y 1 % SDS) y bañadas con el buffer de hibridación (50 % formamida, 25 % SSC 20X, 1 % SDS, 0.05 mg/ml de tRNA y 0.05 mg/ml de heparina) por 15 min a 55 °C. Posteriormente se removió el buffer de hibridación y se les agrego nuevo buffer con 10 ug/ml de la ribosonda y se dejo toda la noche a 55°C. Al día siguiente, se bañaron las laminillas con la solución 1 por 15 min a 50°C tres veces y posteriormente con la solución 3 (50 % formamida y 10 % SSC 20X) por 15 min a 50°C tres veces en la cámara humedecida con PBS. Después se lavaron con TBSTL (150 mM NaCl, 10 mM KCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1 % triton y 1 mM levamisol) por 10 min tres veces y se bloqueo el tejido con 10 % de suero de chivo en TBSTL fresco durante 30 min. Después se incubaron con 1:500 del anticuerpo anti-digoxigenina (Roche. Penzberg, Alemania) en suero-TBSTL en una cámara humedecida con PBS durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se hicieron 2 lavados de 5 min y 2 de 10 min con TBSTL y dos lavados con NTMTL (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris pH 9.5, 0.05 M MgCl₂, 0.1 % tween-20 y 2 mM levamisol) por 10 min. Se bañaron con el revelador BM-purple (Roche) y se incubaron hasta que el color en los cortes fuera notorio. Se hicieron dos lavados con NTMT (NTMTL sin levamisol) de 10 min y tres con PBS de 1 min. Las laminillas se montaron con un cubreobjetos usando cristal mount (Biomed. California, USA) y se almacenaron a temperatura ambiente.

Software y estadística

Todas las figuras se hicieron en Photoshop CS5 (Adobe. California, USA). Pruebas T de Student se realizaron con el programa SPSS statistics 20 (IBM. New York, USA).

APOYOS Y DONACIONES

Este trabajo fue financiado por el proyecto 168642 del CONACYT y por el proyecto IN214511 de DGAPA, UNAM.

Recibí becas por parte del proyecto IX200410 del Observatorio de Visualización IXTLI de la UNAM y por la Red de Desarrollo de Fármacos y Métodos de Diagnóstico (FARMED) del CONACYT.

Agradecemos las donaciones de embriones y larvas por parte de las siguientes personas:

Dra. Cecilia Venegas del laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Dr. Luis Zambrano del laboratorio de Restauración Ecológica del Instituto de Biología, UNAM.

Al Sr Dionisio Slava del criadero de Xochimilco, México DF.

REFERENCIAS

1. P. Weiss. *Principles of development*. Holt, Rinehart & Winston, New York, 1939.
2. S.F. Gilbert. *Developmental biology* 8th edition. Sinauer associates, Massachusetts, 2006.
3. H. Spemann & H. Mangold. *Über induction von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren*. Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik **100**, 599-638 (1924).
4. E.M. DeRobertis. *Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos*. Molecular Cell Biol **7**, 296-302 (2006).
5. L. Wolpert & G. Dover. *Positional information and patter formation*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **295 (1078)**, 441-450 (1981).
6. L. Wolpert. *One hundred years of positional information*. Trends in Genetics **12 (9)**, 359-364 (1996).
7. M. Kerszberg & L. Wolpert. *Specifying positional information in the embryo: looking beyond morphogens*. Cell **130**, 205-209 (2007).
8. L. Wolpert. *Positional information and patterning revisited*. Journal of Theoretical Biology **269**, 359-365 (2011).
9. M. Nahmad & A.D. Lander. *Spatiotemporal mechanisms of morphogen gradient interpretation*. Current Opinion in Genetics & Development **21**, 726-731 (2011).
10. J. Jaeger, D. Irons & N. Monk. *Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information*. Development **135**, 3175-3183 (2008).
11. H. Meinhardt. *Models for the generation and interpretation of gradients*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1:a001362 (2009).
12. M. Tanaka. *Molecular and evolutionary basis of limb field specification and limb initiation*. Development, Growth & Differentiation doi: 10.1111/dgd.12017 (2012).
13. R. Zeller, J. López-Ríos & A. Zuniga. *Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis*. Genetics **10**, 845-858 (2009).
14. J. Bénazet & R. Zeller. *Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1:a001339 (2009).
15. M. Towers & C. Tickle. *Growing models of vertebrate limb development*. Development **136**, 179-190 (2009).
16. M. Towers & C. Tickle. *Generation of pattern and form in the developing limb*. International Journal of Developmental Biology **53**, 805-812 (2009).
17. L. Niswander, C. Tickle, A. Vogel, I. Booth & G.R. Martin. *FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb*. Cell **75**, 579-587 (1993).
18. J.F. Fallon, A. López, M.A. Ros, M.P. Savage, B.B. Olwin & B.K. Simandl. *FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development*. Science **264 (5155)**, 104-107 (1994).
19. R. D. Riddle, R. L. Johnson, E. Laufer & C. Tabin. *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell **75**, 1401-1416 (1993).

20. J. M. W. Slack, G. Lin & Y. Chen. *The Xenopus tadpole: a new model for regeneration research*. Cellular and Molecular Life Sciences **65**, 54-63 (2008).
21. C. W. Beck, J.C. Izpisua-Belmonte & B. Christen. *Beyond early development: Xenopus as an emerging model for the study of regenerative mechanisms*. Developmental Dynamics **238**, 1226-1248 (2009).
22. P.A. Tsonis & T. P. Fox. *Regeneration according to Spallanzani*. Developmental Dynamics **238**, 2357-2363 (2009).
23. K. Agata, Y. Saito & E. Nakajima. *Unifying principles of regeneration I: epimorphosis versus morphallaxis*. Development, Growth and Differentiation **49**, 73-78 (2007).
24. E. Nacu & E. M. Tanaka. *Limb regeneration: a new development?* Annual Review of Cell and Developmental Biology **27**, 29.1-29.32 (2011).
25. D. L. Stocum. *The urodele limb regeneration blastema: a self-organizing system I. Differentiation in vitro*. Developmental Biology **18**, 441-456 (1968).
26. D. L. Stocum. *The urodele limb regeneration blastema: a self-organizing system II. Morphogenesis and differentiation of autografted whole and fractional blastemas*. Developmental Biology **18**, 457-480 (1968).
27. W. Kim & D. L. Stocum. *Retinoic acid modifies positional memory in the anteroposterior axis of regenerating axolotl limbs*. Developmental Biology **114**, 170-179 (1986).
28. R. N. Christensen & R. A. Tassava. *Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs*. Developmental Dynamics **217**, 216-224 (2000).
29. M. Han, J. An & W. Kim. *Expression patterns of fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl*. Developmental Dynamics **220**, 40-48 (2001).
30. K. M. Dungan, T. Y. Wei, J. D. Nace, M. L. Poulin, I. Chiu, J. C. Lang & R. A. Tassava. *Expression and biological effect of urodele fibroblast growth factor 1: relationship to limb regeneration*. Journal of Experimental Zoology **292**, 540-554 (2002).
31. S. Giampaoli, S. Bucci, M. Raghianti, G. Mancino, F. Zhang & P. Ferretti. *Expression of FGF2 in the limb blastema of two salamandridae correlates with their regenerative capability*. Proceedings of the Royal Society B **270**, 2197-2205 (2003).
32. A. Kumar, J. W. Godwin, P. B. Gates, A. A. Garza-Garcia & J. P. Brockes. *Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate*. Science **318**, 772-777 (2007).
33. Y. Imokawa & K. Yoshizato. *Expression of sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds*. PNAS **94**, 9159-9164 (1997).
34. M. A. Torok, D. M. Gardiner, J. C. Izpisua-Belmonte & S. V. Bryant. *Sonic hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs*. Journal of Experimental Zoology **284**, 197-206 (1999).
35. S. Roy, D. M. Gardiner & S. V. Bryant. *Vaccinia as a tool for functional analysis in regenerating limbs: ectopic expression of shh*. Developmental Biology **218**, 199-205 (2000).
36. B. N. Singh, M. J. Doyle, C. V. Weaver, N. Koyano-Nakagawa & D. J. Garry. *Hedgehog and Wnt coordinate signaling in myogenic progenitors and regulate limb regeneration*. Developmental Biology **371 (1)**, 23-34 (2012).

37. T. Endo, S. V. Bryant & D. M. Gardiner. *A stepwise model system for limb regeneration*. *Developmental Biology* **270**, 135-145 (2004).
38. A. Kumar, G. Neville, J. P. Brockes & A. Forge. *A comparative study of gland cells implicated in the nerve dependence of salamander limb regeneration*. *Journal of Anatomy* doi: 10.1111/j. 1469-7580.2010.01239.x (2010).
39. A. Kumar, J. Delgado, P. B. Gates, G. Neville, A. Forge & J. P. Brockes. *The aneurogenic limb identifies developmental cell interactions underlying vertebrate limb regeneration*. *PNAS* **108 (33)**, 13588-13593 (2011).
40. M. Kragl, D. Knapp, E. Nacu, S. Khattak, M. Maden, H. H. Epperlein & E. M. Tanaka. *Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration*. *Nature* **460**, 60-65 (2009).
41. N. Maki, R. Suetsugu-Maki, H. Tarui, K. Agata, K. Del Rio-Tsonis & P. A. Tsonis. *Expression of stem cell pluripotency factors during regeneration in newts*. *Developmental Dynamics* **238**, 1613-1616 (2009).
42. E. Nacu, M. Glausch, H. Q. Le, F. F. R. Damanik, M. Schuez, D. Knapp, S. Khattak, T. Richter & E. M. Tanaka. *Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl*. *Development* **140**, 513-518 (2013).
43. S. Morais da Silva, P. B. Gates & J. P. Brockes. *The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration*. *Developmental Cell* **3**, 547-555 (2002).
44. A. Kumar, P. B. Gates & J. P. Brockes. *Positional identity of adult stem cells in salamander limb regeneration*. *Comptes Rendus Biologies* **330**, 485-490 (2007).
45. A. Garza-Garcia, R. Harris, D. Esposito, P. B. Gates & P. C. Driscoll. *Solution structure and phylogenetics of Prod1, a member of the three-finger protein superfamily implicated in salamander limb regeneration*. *PLoS ONE* **4 (9)**: e7123. Doi:10.1371/journal.pone.0007123 (2009).
46. R. A. Blassberg, A. Garza-Garcia, A. Janmohamed, P. B. Gates & J. P. Brockes. *Functional convergence of signaling by GPI-anchored and anchorless forms of a salamander protein implicated in limb regeneration*. *Journal of Cell Science* **124**, 47-56 (2011).
47. N. Shaikh, P. B. Gates & J. P. Brockes. *The meis homeoprotein regulates the axolotl Prod1 promoter during limb regeneration*. *Gene* **484**, 69-74 (2011).
48. I. A. Niazi & S. Saxena. *Abnormal hind limb regeneration in tadpoles of the toad, Bufo andersoni, exposed to excess vitamin A*. *Folia Biologica* **26 (1)**, 3-8 (1978).
49. M. Maden. *The effect of vitamin A on the regenerating axolotl limb*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **77**, 273-295 (1983).
50. S. R. Scadding & M. Maden. *Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in the axolotl, Ambystoma mexicanum*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **91**, 19-34 (1986).
51. M. Maden. *Positional information: knowing where you are in a limb*. *Current Biology* **12**, R773-R775 (2002).

52. M. Rhinn & P. Dollé. *Retinoic acid signaling during development*. *Development* **139**, 843-858 (2012).
53. K. Niederreither & P. Dollé. *Retinoic acid in development: towards an integrated view*. *Nature Reviews Genetics* **9**, 541-553 (2008).
54. C. Tickle, J. Lee & G. Eichele. *A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development*. *Developmental biology* **109**, 82-95 (1985).
55. X. Liao & M. D. Collins. *All-trans retinoic acid-induced ectopic limb and caudal structures: murine strain sensitivities and pathogenesis*. *Developmental Dynamics* **237**, 1553-1564 (2008).
56. N. Mercader, E. Leonardo, M. E. Piedra, C. Martínez-A, M. A. Ros & M. Torres. *Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of meis genes*. *Development* **127**, 3961-3970 (2000).
57. X. Zhao, I. O. Sirbu, F. A. Mic, N. Molotkova, A. Molotkova, S. Kumar & G. Duester. *Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning*. *Current Biology* **19**, 1050-1057 (2009).
58. T. J. Cunningham, C. Chatzi, L. L. Sandell, P. A. Trainor & G. Duester. *Rdh10 mutants deficient in limb field retinoic acid signaling exhibit normal limb patterning but display interdigital webbing*. *Developmental Dynamics* **240**, 1142-1150 (2011).
59. S. Kumar, L. L. Sandell, P. A. Trainor, F. Koentgen & G. Duester. *Alcohol and aldehyde dehydrogenases: Retinoid metabolic effects in mouse knockout models*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1821**, 198-205 (2012).
60. M. Lewandoski & S. Mackem. *Limb development: the rise and fall of retinoic acid*. *Current Biology* **19**, R558-R561 (2009).
61. N. Mercader, E. M. Tanaka & M. Torres. *Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins*. *Development* **132**, 4131-4142 (2005).
62. S. R. Scadding & M. Maden. *Retinoic acid gradients during limb regeneration*. *Developmental Biology* **162**, 608-617 (1994).
63. C. M. Viviano, C. E. Horton, M. Maden & J. P. Brookes. *Synthesis and release of 9-cis retinoic acid by the urodele wound epidermis*. *Development* **121**, 3753-3762 (1995).
64. S. Keeble & M. Maden. *Retinoic acid-binding protein in the axolotl: distribution in mature tissues and time of appearance during limb regeneration*. *Developmental Biology* **117**, 435-441 (1986).
65. S. Keeble & M. Maden. *The relationship among retinoid structure, affinity for retinoic acid-binding protein, and ability to respecify pattern in the regenerating axolotl limb*. *Developmental Biology* **132**, 26-34 (1984).
66. M. Maden, D. E. Ong, D. Summerbell & F. Chytil. *The role of retinoid-binding proteins in the generation of pattern in the developing limb, the regenerating limb and the nervous system*. *Development supp*: 109-119 (1989).
67. A. M. McCormick, H. E. Shubeita & D. L. Stocum. *Cellular retinoic acid binding protein: detection and quantitation in regenerating axolotl limbs*. *Journal of Experimental Zoology* **245**, 270-276 (1988).

68. M. Theodosiou, J. M. Monaghan, M. L. Spencer, S. R. Voss & D. J. Noonan. *Isolation and characterization of axolotl NPDC-1 and its effects on retinoic acid receptor signaling*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B **147**, 260-270 (2007).
69. E. Samarut & C. Rochette-Egly. *Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development*. Molecular and Cellular Endocrinology **348**, 348-360 (2012).
70. P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R. M. Evans, M. A. Lazar, M. Leid, A. R. de Lera, R. Lotan, D. J. Mangelsdorf & H. Gronemeyer. *International union of pharmacology. LX. Retinoic acid receptors*. Pharmacological Reviews **58** (4), 712-725 (2006).
71. P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R. M. Evans, M. A. Lazar, M. Leid, A. R. de Lera, R. Lotan, D. J. Mangelsdorf & H. Gronemeyer. *International union of pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors*. Pharmacological Reviews **58** (4), 760-772 (2006).
72. M. A. Kane. *Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid*. Biochimica et Biophysica Acta **1821**, 10-20 (2012).
73. M. I. Dawson & Z. Xia. *The retinoid X receptors and their ligands*. Biochimica et Biophysica Acta **1821**, 21-56 (2012).
74. C. W. Ragsdale, M. Petkovich, P. B. Gates, P. Chambon & J. P. Brockes. *Identification of a novel retinoic acid receptor in regenerative tissues of the newt*. Nature **341** (6243), 654-657 (1989).
75. C. W. Ragsdale, P. B. Gates & J. P. Brockes. *Identification and expression pattern of a second isoform of the newt alpha retinoic acid receptor*. Nucleic Acids Research **20** (21), 5851 (1992).
76. C. W. Ragsdale, P. B. Gates, D. S. Hill & J. P. Brockes. *Delta retinoic acid receptor isoform d1 is distinguished by its exceptional N-terminal sequence and abundance in the limb regeneration blastema*. Mechanisms of Development **40**, 99-112 (1992).
77. D. S. Hill, C. W. Ragsdale & J. P. Brockes. *Isoform-specific immunological detection of newt retinoic acid receptor d1 in normal and regenerating limbs*. Development **117**, 937-945 (1993).
78. L. Wirtanen & C. Séguin. *Cloning of cDNAs encoding retinoic acid receptors RARg1, RARg2, and a new splicing variant, RARg3, from Ambystoma mexicanum and characterization of their expression during early development*. Biochimica et Biophysica Acta **1492**, 81-93 (2000).
79. J. M. Alfaro, M. Ricote, M. V. T. Lobo, M. Royuela, B. Fraile, R. Paniagua & M. I. Arenas. *Immunohistochemical detection of the retinoid acid receptors (RXR- α , - β , - γ) and farnesoid X-activated receptor (FXR) in the marbled newt along the annual cycle*. Molecular Reproduction and Development **62**, 216-222 (2002).
80. C. Carter, A. Clark, G. Spencer & R. Carlone. *Cloning and expression of a retinoic acid receptor b2 subtype from the adult newt: evidence for an early role in tail and caudal spinal cord regeneration*. Developmental Dynamics **240**, 2613-2625 (2011).
81. M. Mark, N. B. Ghyselinck & P. Chambon. *Function of retinoic acid receptors during embryonic development*. Nuclear Receptor Signaling **7**, DOI: 10.1621/nrs.07002 (2009).

82. J. G. Schilthuis, A. A. F. Gann & J. P. Brockes. *Chimeric retinoic acid/thyroid hormone receptors implicate RAR- α 1 as mediating growth inhibition by retinoic acid.* EMBO **12** (9), 3459-3466 (1993).
83. L. T. Pecorino, D. C. Lo & J. P. Brockes. *Isoform-specific induction of a retinoid-responsive antigen after biolistic transfection of chimaeric retinoic acid/thyroid hormone receptors into a regenerating limb.* Development **120**, 325-333 (1994).
84. L. T. Pecorino, A. Entwistle & J. P. Brockes. *Activation of a single retinoic acid receptor isoform mediates proximodistal respecification.* Current Biology **6** (5), 563-569 (1996).
85. A. L. Mescher. *Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface.* Journal of Experimental Zoology **195** (1): 117-128 (1976).
86. V. Vinarsky, D. L. Atkinson, T. J. Stevenson, M. T. Keating & S. J. Odelberg. *Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function.* Developmental Biology **279**: 86-98 (2005).
87. E. V. Yang, D. M. Gardiner, M. R. J. Carlson, C. A. Nugas & S. V. Bryant. *Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration.* Developmental Dynamics **216**: 2-9 (1999).
88. S. Minucci, M. Leid, R. Toyama, J.P. Saint-Jeannet, V. J. Peterson, V. Horn, J.E. Ishmael, N. Bhattacharyya, A. dey, I. B. Dawid & K. Ozato. *Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-Retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression.* Molecular and Cellular Biology **17** (2): 644-655 (1997).
89. P. A. Tsonis, C. H. Washabaugh & K. Del Rio-Tsonis. *Morphogenetic effects of 9-cis-retinoic acid on the regenerating limbs of the axolotl.* Roux's Arch Dev Biol **203**: 230-234 (1994).
90. J. J. Lipsky, M. L. Shen & S. Naylor. *Overview – In vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites.* Chemico-Biological Interactions **130-132**: 81-91 (2001).
91. M. Maden. *Retinoids as endogenous components of the regenerating limb and tail.* Wound Repair and Regeneration **6** (4): S358-S365 (1998).
92. S. R. Scadding. *Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesis, modifies pattern formation during limb regeneration in the axolotl *Ambystoma mexicanum*.* Can J Zool **77**: 1835-1837 (1999).
93. S. V. Del Rincón & S. R. Scadding. *Retinoid antagonists inhibit normal patterning during limb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*.* Journal of Experimental Zoology **292**: 435-443 (2002).
94. D. L. Stocum & J. A. Cameron. *Looking proximally and distally: 100 years of limb regeneration and beyond.* Developmental Dynamics **240**: 943-968 (2011).
95. K. Niederreither, J. Vermot, B. Schuhsaur, P. Chambon & P. Dollé. *Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse.* Development **129**: 3563-3574 (2002).
96. S. Kumar, L. L. Sandell, P. A. Trainor, F. Koentgen & G. Duyster. *Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models.* Biochimica et Biophysica Acta **1821**: 198-205 (2012).

97. C. S. Johnson, R. M. Zucker, E. S. Hunter III & K. K. Sulik. *Perturbation of retinoic acid (RA)-mediated limb development suggests a role for diminished RA signaling in the teratogenesis of ethanol*. Birth Defects Research (Part A) **79**: 631-641 (2007).
98. T. J. Cunningham, C. Chatzi, L. L. Sandell, P. A. Trainor & G. Duester. *Rdh10 mutants deficient in limb field retinoic acid signaling exhibit normal limb patterning but display interdigital webbing*. Developmental Dynamics **240**: 1142-1150 (2011).
99. J. R. Monaghan & M. Maden. *Visualization of retinoic acid signaling in transgenic axolotlz during limb development and regeneration*. Developmental Biology **368** (1): 63-75 (2012).
100. L. E. Iten & S. V. Bryant. *The interaction between the blastema and stump in the establishment of the anterior-posterior and proximal-distal organization of the limb regenerate*. Developmental Biology **44**: 119-147 (1975).
101. D. L. Stocum. *Regulation after proximal or distal transposition of limb regeneration blastemas and determination of the proximal boundary of the regenerate*. Developmental Biology **45**: 112-136 (1975).
102. K. Echeverri & E. M. Tanaka. *Proximodistal patterning during limb regeneration*. Developmental Biology **279**: 391-401 (2005).
103. D. M. Gardiner, B. Blumberg, Y. Komine & S. V. Bryant. *Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs*. Development **121**: 1731-1741 (1995).
104. M. A. Torok, D. M. Gardiner, N. H. Shubin & S. V. Bryant. *Expression of HoxD genes in developing and regenerating axolotl limbs*. Developmental Biology **200**: 225-233 (1998).
105. J. McEwan, J. Lynch & C. W. Beck. *Expression of key retinoic acid modulating genes suggests active regulation during development and regeneration of the amphibian limb*. Developmental Dynamics **240**: 1259-1270 (2011).
106. T. Kato, K. Miyazaki, K. Shimizu-Nishikawa, K. Koshihara, M. Obara, H. K. Mishima & K. Yoshizato. *Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs*. Developmental Dynamics **226**: 366-376 (2003).
107. R. J. Tan & Y. Liu. *Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases*. Am J Physiol Renal Physiol **302**: F1351-1361 (2012).
108. T. J. Stevenson, V. Vinarsky, D. L. Atkinson, M. T. Keating & S. J. Odelberg. *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 regulates matrix metalloproteinase activity during newt limb regeneration*. Developmental Dynamics **235**: 606-616 (2006).
109. N. Santosh, L. J. Windsor, B. S. Mahmoudi, B. Li, W. Zhang, E. A. Chernoff, N. Rao, D. L. Stocum & F. Song. *Matrix metalloproteinase expression during blastema formation in regeneration-competent versus regeneration-deficient amphibian limbs*. Developmental Dynamics **240**: 1127-1141 (2011).
110. H. Liu, C. Zang, M. H. Fenner, K. Possinger & E. Elstner. *PPARγ ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro*. Breast Cancer Research and Treatment **79**: 63-74 (2003).
111. A. Dutta, T. Sen & A. Chatterjee. *All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates MMP-9 by modulating its regulatory molecules*. Cell Adhesion & Migration **4** (3): 409-418 (2010).

112. S. Balasubramanian, R. A. S. Chandraratna & R. L. Eckert. *A novel retinoid-related molecule inhibits pancreatic cancer cell proliferation by a retinoid receptor independent mechanism via suppression of cell cycle regulatory protein function of caspase-associated apoptosis*. *Oncogene* **24**: 4257-4270 (2005).
113. L. Wang, J. P. Mear, C-Y Kuan & M. C. Colbert. *Retinoic acid induces CDK inhibitors and growth arrest specific (Gas) genes in neural crest cells*. *Development, Growth and Differentiation* **47**: 119-130 (2005).
114. M. Radu, D. R. Soprano & K. J. Soprano. *S10 phosphorylation of p27 mediates atRA induced growth arrest in ovarian carcinoma cell lines*. *Journal of Cellular Physiology* **217**: 558-568 (2008).
115. J. Wang & A. Yen. *A MAPK-positive feedback mechanism for BLR1 signaling propels retinoic acid-triggered differentiation and cell cycle arrest*. *The Journal of Biological Chemistry* **283** (3): 4375-4386 (2008).
116. A. Wang, I. N. Alimova, P. Luo, A. Jong, T. J. Triche & L. Wu. *Loss of CAK phosphorylation of RAR α mediates transcriptional control of retinoid-induced cancer cell differentiation*. *FASEB Journal* **24**: 833-843 (2010).
117. Y. Lu, S. Bertran, T-A. Samuels, R. Mira-y-Lopez & E. Farias. *Mechanism of inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 induced mammary oncogenesis by RAR α agonist AM580*. *Oncogene* **29** (25): 3665-3676 (2010).
118. M. D. Salazar, M. Ratnam, M. Patki, I. Kisovic, R. Trumbly, M. Iman & M. Ratnam. *During hormone depletion or tamoxifen treatment of breast cancer cells the strogen receptor apoprotein supports cell cycling through the retinoic acid receptor α 1 apoprotein*. *Breast Cancer Research* **13**: R18 (2011).
119. A. Yen, R. Fenning, R. Chandraratna, P. Walker & S. Varvayanis. *A retinoic acid receptor b/g-selective prodrug (tazarotene) plus a retinoid X receptor ligand induces extracellular signal-regulated kinase activation, retinoblastoma hypophosphorylation, G0 arrest, and cell differentiation*. *Molecular Pharmacology* **66**: 1727-1737 (2004).
120. B. Roy, R. Taneja & P. Chambon. *Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RAREceptor α (RAR α)-, RAR β , or RAR γ -selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand*. *Molecular and Cellular Biology* **15** (12): 6481-6487 (1995).
121. H-G. Simon & C. J. Tabin. *Analysis of Hox-4.5 and Hox-3.6 expression during newt limb regeneration: differential regulation of paralogous Hox genes suggest different roles for members of different Hox clusters*. *Development* **117**: 1397-1407 (1993).
122. E. Galdones, D. Lohnes & B. F. Hales. *Role of retinoic acid receptors α 1 and γ in the response of murine limbs to retinol in vitro*. *Birth Defects Research (Part A)* **76**: 39-45 (2006).
123. S. Malik. *Syndactyly: phenotypes, genetics and current classification*. *European Journal of Human Genetics* **20**: 817-824 (2012).
124. K. Bosse, R. C. Betz, Y-A. Lee, T. F. Wienker, A. Reis, H. Kleen, P. Propping, S. Cichon & M. M. Nöthen. *Localization of a gene for syndactyly type 1 to chromosome 2q34-q36*. *Am J Hum Genet* **67**: 492-497 (2000).

125. N. Brison, P. Debeer, S. Fantini, C. Oley, V. Zappavigna, F. P. Luyten & P. Tylzanowski. *An N-terminal G11A mutation in HOXD13 causes synpolydactyly and interferes with Gli3R function during limb pre-patterning*. *Human Molecular Genetics* **21** (11): 2464-2475 (2012).
126. P. Kuss, P. Villavicencio-Lorini, F. Witte, J. Klose, A. N. Albrecht, P. Seemann, J. Hecht & S. Mundlos. *Mutant Hoxd13 induces extra digits in a mouse model of synpolydactyly directly and by decreasing retinoic acid synthesis*. *J Clin Invest* **119**: 146-156 (2009).
127. E. Galdones & B. F. Hales. *Retinoic acid receptor gamma-induced misregulation of chondrogenesis in the murine limb bud in vitro*. *Toxicological Sciences* **106** (1): 223-232 (2008).
128. F. Pettersson, N. Hanna, M. Lagodich, D. Dupéré-Richer, M-C. Couture, C. Choi & W. H. Miller Jr. *Rexinoids modulate steroid and xenobiotic receptor activity by increasing its protein turnover in a calpain-dependent manner*. *The Journal of Biological Chemistry* **283** (32): 21945-21952 (2008).
129. M. Gianni, A. Tarrade, E. A. Nigro, E. Garattini & C. Rochette-Egly. *The AF-1 and AF-2 domains of RAR γ 2 and RXR α cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR γ 2/RXR α heterodimers*. *The Journal of Biological Chemistry* **278** (36): 34458-34466 (2003).
130. X-F. Lin, B-X. Zhao, H-Z. Chen, X-F. Ye, C-Y. Yang, H-Y. Zhou, M-Q. Zhang, S-C. Lin & Q. Wu. *RXR α acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells*. *Journal of Cell Science* **117**: 5609-5621 (2004).
131. H. Meinhardt. *A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs*. *J Embryol exp Morph* **76**: 115-137 (1983).
132. V. French, P. J. Bryant & S. V. Bryant. *Pattern regulation in epimorphic fields*. *Science* **193**: 969-980 (1976).
133. M. Maden. *The effect of vitamin A on limb regeneration in Rana temporaria*. *Developmental Biology* **98**: 409-416 (1983).
134. D. Summerbell. *The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb*. *J Embryol exp Morph* **78**: 269-289 (1983).
135. S. R. Scadding & M. Maden. *Comparison of the effects of vitamin A on limb development and regeneration in Xenopus laevis tadpoles*. *J Embryol exp Morph* **91**: 35-53 (1986).
136. S. R. Scadding & M. Maden. *The effects of local application of retinoic acid on limb development and regeneration in tadpoles of Xenopus laevis*. *J Embryol exp Morph* **91**: 35-53 (1986).
137. S. D. Thoms & D. L. Stocum. *Retinoic acid-induced pattern duplication in regenerating urodele limbs*. *Developmental Biology* **103**: 319-328 (1984).
138. B-G. Ju & W-S. Kim, *Pattern duplication by retinoic acid treatment in the regenerating limbs of Korean salamander larvae, Hynobius leechii, correlates well with the extent of dedifferentiation*. *Developmental Dynamics* **199**: 253-267 (1994).

139. D. C. Ludolph, J. A. Cameron & D. L. Stocum. *The effect of retinoic acid on positional memory in the dorsoventral axis of regenerating axolotl limbs*. *Developmental Biology* **140**: 41-52 (1990).
140. J. Monkemeyer, D. C. Ludolph, J. A. Cameron & D. L. Stocum. *Retinoic acid-induced change in anteroposterior positional identity in regenerating axolotl limbs is dose-dependent*. *Developmental Dynamics* **193**: 286-294 (1992).
141. H. Meinhardt. *Models of biological pattern formation*. Academic Press (1982).
142. R. D. Riddle, M. Ensini, C. Nelson, T. Tsuchida, T. M. Jessell & C. Tabin. *Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by Wnt7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb*. *Cell* **83**: 631-640 (1995).
143. T. Shimokawa, S. Yasutaka, R. Kominami & H. Shinohara. *Lmx-1b and Wnt-7a expression in axolotl limb during development and regeneration*. *Okajamas Folia Anat Jpn* **89** (4): 119-124 (2013).
144. J. T. Johnson, M. S. Hansen, I. Wu, L. J. Healy, C. R. Johnson, G. M. Jones, M. R. Capecchi & C. Keller. *Virtual histology of transgenic mouse embryos for high-throughput phenotyping*. *PLoS Genetics* **2** (4): e61 (2006).
145. M. Theodosiou, V. Laudet & M. Schubert. *From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway*. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1423-1445 (2010).
146. X-H. Tang & L. J. Gudas. *Retinoids, retinoic acid, and cancer*. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **6**: 345-364 (2011).
147. L. J. Gudas. *Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1821**: 213-221 (2012).