



Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXIX**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

CONTROL MOLECULAR DE LA APOPTOSIS DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LA EXTREMIDAD.

René Fernando Abarca-Buis, Alberto Jesús Rios-Flores, Jesús Chimal-Monroy.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional autónoma de México, Apartado Postal 70-228 México DF 04510.
jchimal@servidor.unam.mx

Abstract.

The developing limb bud is an excellent model to analyze the molecular mechanisms that regulate the programmed cell death or apoptosis. During the formation of the limb appear four apoptotic zones that control the morphogenesis of the limb. The most extensively studied of the apoptotic zones is the interdigital zone. Here the molecular signals that control this process belongs to the family of proteins morphogenetic of smad the bone (BMP), these molecules bind to their receptors and transduce the signal through proteins. The pro-apoptotic activity of BMP signaling requires the interaction with other signaling molecules such as fibroblast growth factors (FGF), Wingless int-related protein (WNT) and retinoic acid. The FGF, WNT and retinoic acid modulate as well the capacity of BMPs to induce the apoptosis in the interdigits.

Keywords: Apoptosis, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), limb morphogenesis, Retinoic Acid, Fibroblast Growth Factor (FGFs).

Introducción

Durante el desarrollo de los organismos multicelulares se generan distintos tipos celulares que darán origen a diferentes tejidos y órganos. De manera que el balance correcto entre la diferenciación, la proliferación y la muerte celular determinan el destino de los distintos linajes celulares y el número de células que conforman un órgano. La apoptosis o muerte celular

programada es parte esencial de la vida de los metazoarios, a menudo en los organismos se produce un mayor número de células de las necesarias, entonces la apoptosis juega un papel importante al eliminar células que se encuentran en exceso o para esculpir tejidos.

La extremidad embrionaria del pollo: un modelo para el estudio de la apoptosis

La extremidad en desarrollo del pollo ha sido uno de los modelos más recurrentes para el estudio de la apoptosis ya que presenta varias zonas que son eliminadas por este proceso. La zona necrótica anterior (ANZ) y la zona necrótica posterior (PNZ) son áreas del mesodermo que, respectivamente, rodean los bordes anteriores y posteriores de las extremidades embrionarias (Fig. 1A). A pesar de su nombre, estas zonas son eliminadas por apoptosis desde etapas tempranas y se han relacionado con la reducción en el número de dedos en las aves (tres dedos en las alas y cuatro en las patas). En algunas mutantes de pollo que presentan polidactilias (incremento en el número de dedos) no exhiben estas zonas apoptóticas [1]. Además, el pollo mutante característico por la ausencia de alas wingless, presenta durante su desarrollo embrionario una ANZ bastante extendida que correlaciona con la pérdida de las alas [2]. Cabe destacar que en los mamíferos con pentadactilia (cinco dedos) no aparecen estas áreas de apoptosis. El parche opaco es otra zona presente en el mesénquima central de la extremidad embrionaria de aves y de mamíferos que, se piensa, está relacionada en la separación de la ulna y el radio en las extremidades anteriores, y de la tibia y la fíbula en las posteriores. El pollo mutante *talpid3* carece de esta área de apoptosis y exhibe la fusión de estos dos huesos [3]. Debido a su tamaño y acceso, las áreas apoptóticas de las zonas interdigitales de los pollos son los modelos que más se usan para estudiar los mecanismos de la apoptosis *in vivo*. Como su nombre lo indica, las zonas interdigitales ó interdígitos se localizan entre los dedos (Fig. 1 E-G), y dependiendo de la especie, estas zonas se eliminan ó permanecen durante la vida adulta del organismo, participando de manera importante en la morfogénesis de las extremidades de los adultos. Por ejemplo, en especies con dedos separados tales como el pollo [4], el lagarto [5], el ratón y el humano [6,7] la apoptosis se extiende en todo el espacio interdigital, pero en el pato ó la tortuga que presentan este tejido permanentemente, la apoptosis solo se activa en la parte más distal [8,5].

Además del mesodermo, la apoptosis también es activada en el ectodermo, en una región muy importante para el desarrollo de la extremidad denominada Cresta Ectodérmica Apical (AER) (Fig. 1C). La AER es un engrosamiento del ectodermo localizado en la parte más distal de la extremidad embrionaria y es una estructura muy importante ya que dirige el crecimiento próximo-distal de la extremidad. La eliminación de la AER genera el truncamiento de la extremidad mientras que la presencia de dos AER en donde originalmente hay una, genera bifurcación de ella [9]. Se ha observado que la apoptosis regula el tamaño de la AER de tal manera que pueda realizar su función de manera muy precisa durante todo el desarrollo de la extremidad. Con base en esto, el incremento de células apoptóticas en la AER resulta en un truncamiento parcial ó completo de la extremidad [10], proceso que se presenta de forma natural en las serpientes [11]. De acuerdo con estas observaciones, se ha reportado que en etapas del desarrollo donde ocurre la formación de los dedos, se presentan polidactilias o disminución en el número de dedos dependiendo si hay una inhibición o un aumento de la apoptosis en la AER en embriones de ratón [12]. Todas estas observaciones evidencian el importante papel de la apoptosis para que las extremidades se formen correctamente. En este sentido, en la figura 1 mostramos la expresión de algunos genes cuya expresión correlaciona con las zonas de

apoptosis en la extremidad y cuya función está directamente relacionada con el control de éste proceso.

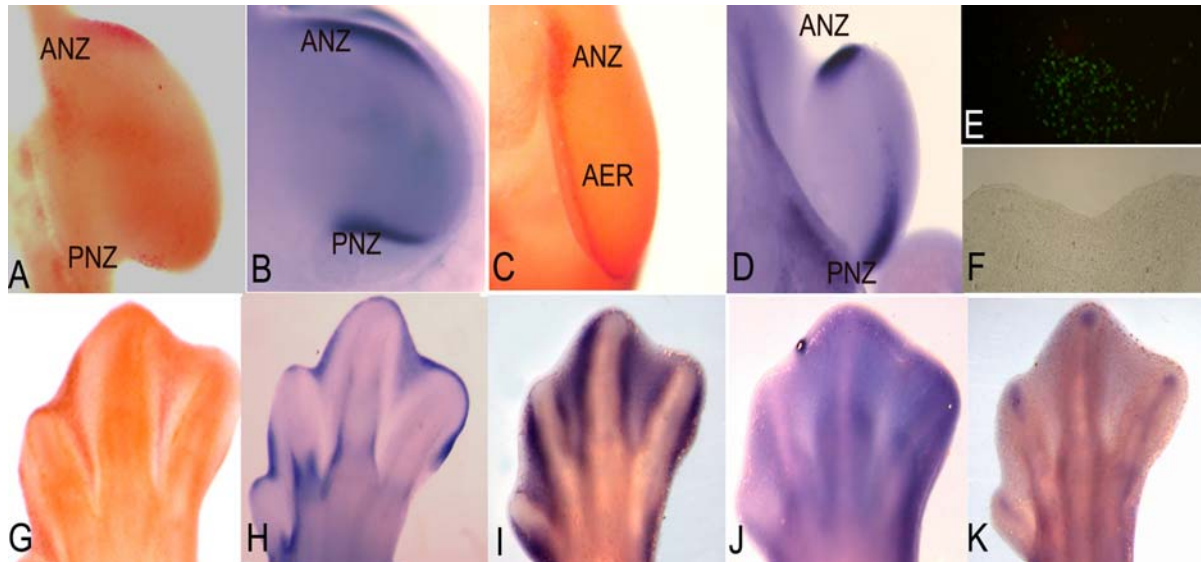


Figura 1. La expresión de *Dkk* y moléculas involucradas con el señalamiento de BMPs coinciden con las zonas de apoptosis en la extremidad. En las imágenes A-D la parte superior de la imagen corresponde a la región anterior de la extremidad y la parte inferior corresponde a la región posterior. A) Extremidad de embrión en etapa 22 del desarrollo embrionario (E-22), donde se observan las zonas necróticas anterior y posterior positivas a la tinción de rojo neutro, que tiñe células muertas, en este caso sabemos que mueren por apoptosis. B) Expresión genética de *Dkk* en extremidades de embrión de pollo E-22 en la zona necrótica anterior y posterior. C) Extremidad de embrión de pollo E-23 donde se observa la Cresta Apical Ectodérmica y la zona necrótica anterior positiva a la tinción de rojo neutro. D) Expresión genética de *Dkk* en extremidades de pollo E-23, en donde se observa la expresión en las zonas necróticas anterior y posterior. E) Se muestra la reacción de TUNEL (transferase-mediated dUTP nick end labeling) para evidenciar que las células de los interdógitos son apoptóticas. F) Corte histológico observado en la figura E en campo claro, para mostrar la ubicación del área de apoptosis. G) Extremidad de embrión E-32 donde se observa la muerte celular en los interdógitos, positivos a la tinción de rojo neutro que coincide con la reacción de TUNEL. H-K) La hibridación in situ de *Dkk* (H), de *Bmp7* (I) y de *Alk2* (J) muestra la expresión de estos genes en los interdógitos. Mientras que la expresión del gen *Bmpr1b* (K) se localiza en la punta de los dedos, pero no en las zonas de muerte celular por apoptosis.

Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) promueven la apoptosis en los interdógitos

Entre las señales que regulan la apoptosis en la extremidad está la perteneciente a la de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). Las BMPs son miembros de la superfamilia de los TGF β , moléculas secretadas al medio extracelular, que regulan la proliferación, la

diferenciación, la migración y la apoptosis [13]. Varias isoformas de las BMPs tales como la BMP2, la BMP4, la BMP5 y la BMP7 participan en la regulación de la apoptosis en la extremidad embrionaria de aves y mamíferos [14,15]. El patrón de expresión de estas moléculas coincide con la ANZ, la PNZ y la región interdigital, sugiriendo una posible participación de la señalización de las BMPs sobre el destino de estos tejidos (Figura 1I-K) [15,16]. La aplicación de las formas protéicas de las BMPs en el interdígito resulta en la aceleración de la apoptosis (Figura 2A, B) [15-18].

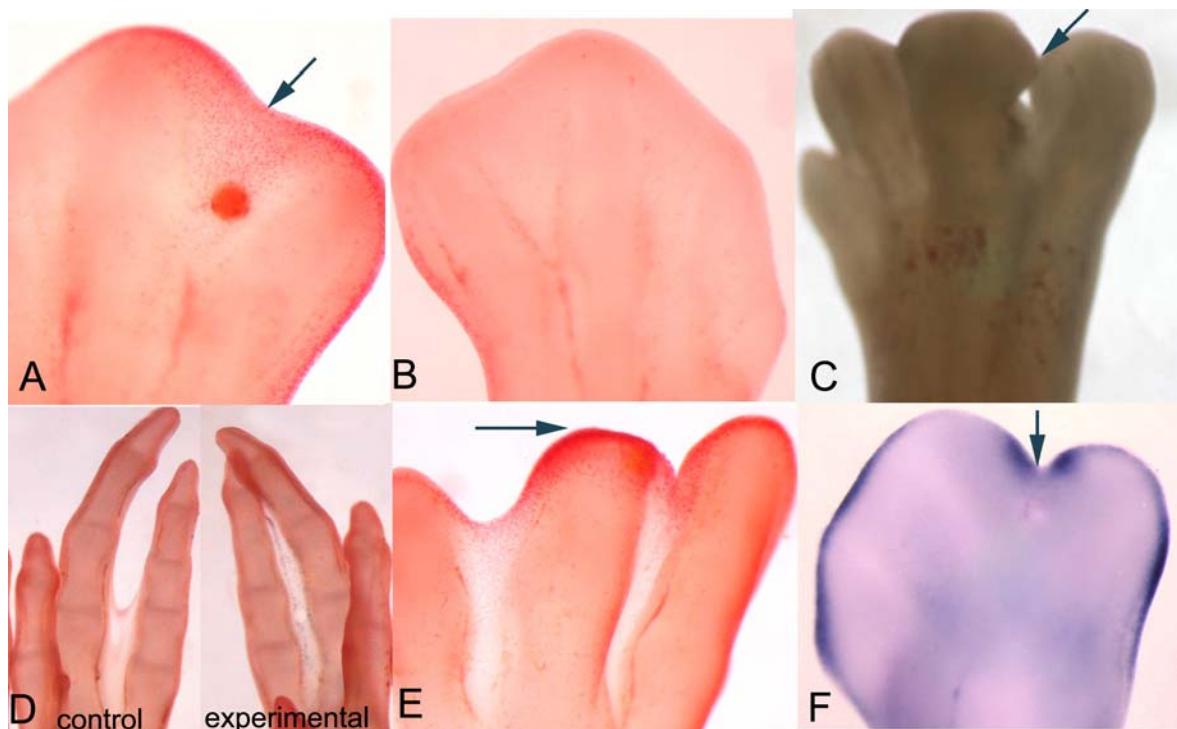


Figura 2. Las BMPs y el ácido retinoico son moléculas que inducen la apoptosis en el interdígito. A) Inducción de la muerte celular en el tercer interdígito por el ácido retinoico en la extremidad de pollo tratada en E-28 y después de 18 horas de la aplicación del ácido retinoico. Las células positivas a rojo neutro son las células apoptóticas. B) Extremidad control de la misma etapa del desarrollo que en A), donde no se observa apoptosis. C) Después de 48 horas de tratamiento con el ácido retinoico se observa regresión acelerada del interdígito. D) Inhibición de la muerte interdigital por la aplicación de noggin, antagonista de BMPs, en E-29 después de 72 horas de su aplicación. Se observa la permanencia de la membrana interdigital mientras que en el control la regresión de la membrana está avanzada. E) Inducción de la muerte por la aplicación de ácido retinoico en la punta del dedo en E-29, después de 72 horas se observa claramente un patrón de muerte en la punta del dedo que genera el truncamiento del mismo. F) Inducción de la expresión de Dkk en el interdígito por la aplicación de ácido retinoico.

Contrariamente, la aplicación de antagonistas de las BMPs, como Noggin ó gremlin en el interdígito, resulta en la inhibición de la apoptosis de este tejido (Figura 2D) [19,20]. De igual

manera, la eliminación de BMP7 en ratones resulta en la inhibición de la muerte celular en el interdígito, generando sindactilias (dedos unidos por las membranas interdigitales) y polidactilias [21] sugiriendo la participación de las BMPs en el control de la apoptosis en los interdígitos y en el número de dedos.

Transducción de la señal de las BMPs.

Las BMPs se unen a receptores de membrana para llevar a cabo su función, la generación de formas constitutivas activas y dominantes negativas de éstos permiten obtener información relevante sobre la función de las BMPs en el control de la apoptosis. Todos los miembros de la familia de las BMPs ejercen su acción celular uniéndose a dos tipos de receptores transmembranales (receptores tipo I y tipo II) que son cinasas de serina/treonina, ambos esenciales para transducir la señal de los ligandos [22,23]. El complejo hetero-oligomérico que inicia la transducción de la señal consiste de dos receptores tipo II, dos receptores tipo I y el ligando que es un homodímero [24]. Los receptores tipo II son cinasas constitutivamente activas que una vez formado el complejo ligando-receptor, fosforilan a los receptores tipo I en un dominio rico en glicinas y serinas, localizado por arriba del sitio de actividad catalítica del receptor, denominado dominio GS [25]. Esta fosforilación activa el sitio cinasa del receptor tipo I que a su vez actúa sobre los sustratos intracelulares, como son las proteínas Smad (Fig. 3) ó proteínas relacionadas a la vía de las cinasas activadas por mitógenos (Fig. 4; MAPK) [26]. De esta manera, los receptores tipo I determinan la especificidad de las señales intracelulares. La sustitución de una treonina o una glutamina por un aminoácido ácido en el dominio GS resulta en la activación constitutiva del sitio cinasa serina/treonina del receptor tipo I, independientemente de la presencia del ligando y del receptor tipo II [27]. Contrariamente, formas dominantes negativas de los receptores tipo I son obtenidas por la sustitución de una lisina por una arginina en el sitio de unión del ATP lo que reduce dramáticamente su actividad cinasa [28]. Existen tres receptores tipo I que transducen la señal de los miembros de la familia de las BMPs. A estos receptores se les ha denominado BMPR-1A ó ALK-3, BMPR-1B ó ALK-6 [29,30] y ALK-2 [31]. La especificidad de la señal intracelular dirigida por el receptor tipo I radica en una región específica presente en el sitio cinasa denominada el asa L45 [32]. El asa L45 de BMPR-1A/ALK-3 y de BMPR-1B/ALK-6 es idéntica y aunque el asa L45 de ALK-2 difiere ligeramente de la de los otros dos receptores, los tres interactúan con sustratos muy similares [33].

Como se ha mencionado, las proteínas Smad son algunos efectores de la transducción de la señal de los miembros de la superfamilia del TGF β . Tres tipos de proteínas Smad, la Smad1, la Smad5 y la Smad8 son fosforiladas y activadas por los receptores tipo I de BMPs [34-36]. A estas Smad se les conoce como R-Smad, debido a que son activadas por los receptores tipo I. La activación de las R-Smad induce la formación de un complejo trimérico con la Smad4, generalmente necesario para que estos complejos viajen al núcleo y regulen la transcripción de genes blanco, ya sea por una unión directa al DNA o indirecta por medio de otros cofactores [26]. Otras proteínas relacionadas, las Smad inhibitoras (I-Smad), bloquean la transducción de la señal dependiente de las R-Smad. Se han reconocido dos Smad inhibitoras en vertebrados, la Smad6 y la Smad7 que estructuralmente son diferentes de las otras Smad. Las I-Smad interactúan de manera estable con los receptores tipo I impidiendo la fosforilación de las R-Smad [37,38]. La competencia entre las I-Smad y las R-Smad por los receptores tipo I es un mecanismo de regulación general para todos los miembros de la superfamilia del TGF- β . La

Smad6 actúa también por otro mecanismo, impide la formación del complejo R-Smad de BMPs y la Smad4, inhibiendo la translocación de las R-Smad al núcleo, por lo tanto la Smad6 inhibe preferencialmente la vía de las BMPs (Figura 3) [39].

Otros substratos intracelulares de los receptores tipo I de BMPs son las MAPK. La vía en la que se involucra la MAPK p38 es activada por las BMPs en células de mamífero y de *Drosophila* [40]. Se ha observado que p38 induce la fosforilación del factor de transcripción ATF-2 que puede interactuar con las Smads para activar la transcripción. Otra MAPK activada directamente por el receptor tipo I de BMPs es TAK1. Esta cinasa induce la activación de JNK que a su vez activa a la proteína C-JUN (Figura 4). Tanto C-JUN como p38 se han involucrado en la activación de la apoptosis en algunos modelos experimentales [41,42].

Los receptores tipo I de las BMPs controlan la apoptosis inducida por las BMPs en los interdígitos

La sobre-expresión de las formas dominantes negativas de BMPR-1A/ALK3 y de BMPR-1B/ALK6 en extremidades embrionarias de pollo resulta en el truncamiento de los dedos, así como en la inhibición de la muerte interdigital [18,28]. Por otro lado, la sobreexpresión de las formas constitutivas activas de estos dos receptores produce engrosamiento de los elementos esqueléticos y sólo para el caso de BMPR1B se acelera la muerte interdigital [43]. Estos trabajos demuestran que las BMPs regulan activamente la apoptosis y la condrogénesis (la formación del cartílago) en la extremidad embrionaria.

Una vez comprobada la participación de las BMPs tanto en el crecimiento y la diferenciación del cartílago así como en la regresión del tejido interdigital, se sospechó que estas distintas respuestas dependían del tipo de receptor que expresan las células destinadas a diferenciarse ó morir. Trabajos posteriores, propusieron que las BMPs participan en la diferenciación del cartílago en etapas tempranas a través de BMPR-1B/ALK6, mientras que BMPR-1A/ALK3 y ALK2 regulan el establecimiento de la placa de crecimiento de los huesos largos en etapas posteriores del desarrollo [43,44]. Sin embargo, y a pesar de que la sobre-expresión de las formas dominantes negativas de BMPR1A y de BMPR1B inhiben la apoptosis interdigital, los patrones de expresión de los genes que codifican para estos receptores no coinciden con las áreas de muerte en la extremidad del pollo en desarrollo. La expresión endógena de *bmpR-1b* se localiza exclusivamente en las regiones condrogénicas, en donde se forman los dedos (Figura 1K), mientras que *bmpR1a*, se expresa en la parte más distal de la extremidad, en las células subyacentes a la *AER* [19]. Posteriormente este gen es expresado en las células prehipertróficas que forman parte de la placa de crecimiento de los elementos esqueléticos ya establecidos, pero no en las zonas de apoptosis [43]. La aplicación de factores que inducen la condrogénesis, tales como el TGF- β en el interdígito generan inhibición de la apoptosis interdigital y la formación de un dedo extra. La aplicación de estos factores dispara la cascada molecular relacionada a la condrogénesis en el que se incluye la inducción del gene que codifica para BMPR-1B/ALK6, lo que indica que este receptor está involucrado en la diferenciación del cartílago, más no en la regulación de la apoptosis [19,45]. Estos resultados descartan la posibilidad de que BMPR-1B y BMPR-1A sean los receptores endógenos por los cuales las BMPs inducen la muerte celular.

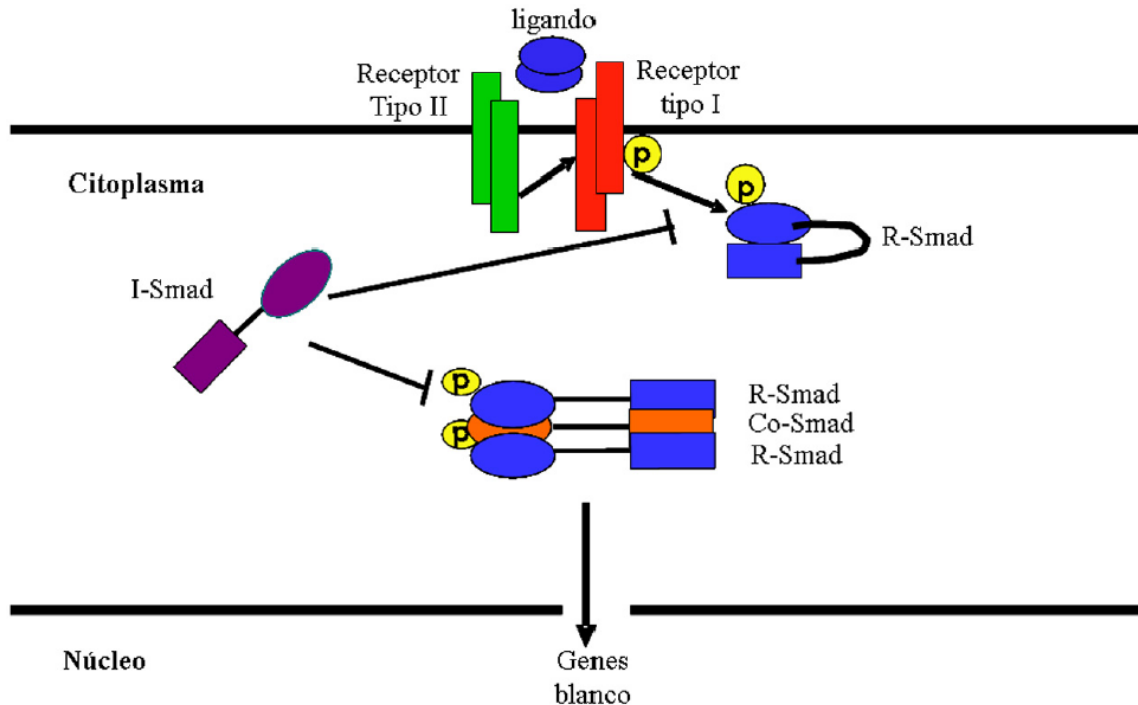


Figura 3. Vía de transducción de las BMPs dependiente de las Smads. El ligando que puede ser cualquiera de las isoformas de las BMPs se unen a dos receptores transmembranales denominados receptores tipo II y tipo I. Una vez formado este complejo hetero-oligomérico, el receptor II fosforila al receptor tipo I, el cual a su vez activa a las proteínas transductoras de la señal denominadas R-Smad. Las R-Smad forman un complejo trimérico con una Smad acompañante ó Co-Smad que se transloca al núcleo para activar la expresión de genes blanco. Las I-Smad ó smad inhibitoras son antagonistas de la vía de las smads que presentan dos mecanismos de acción: uno es compitiendo por el receptor tipo I con las R-Smad ó impidiendo la formación del complejo R-smad/Co-Smad.

Se conoce que *alk2* se expresa en todo el mesénquima del ala en desarrollo y la sobre-expresión de la forma constitutiva activa de *alk2* inhibe la formación de las articulaciones y promueve la expansión del cartílago, además de retrasar la maduración de los condrocitos en los elementos cartilagosos ya establecidos [44].

Actualmente, en nuestro laboratorio hemos observado que el patrón de expresión de este receptor coincide claramente con la apoptosis en el interdígito (Fig. 1J), y por lo tanto sugerimos con estas observaciones que este receptor es candidato muy fuerte, por el cual las BMP controlan la apoptosis en el interdígito.

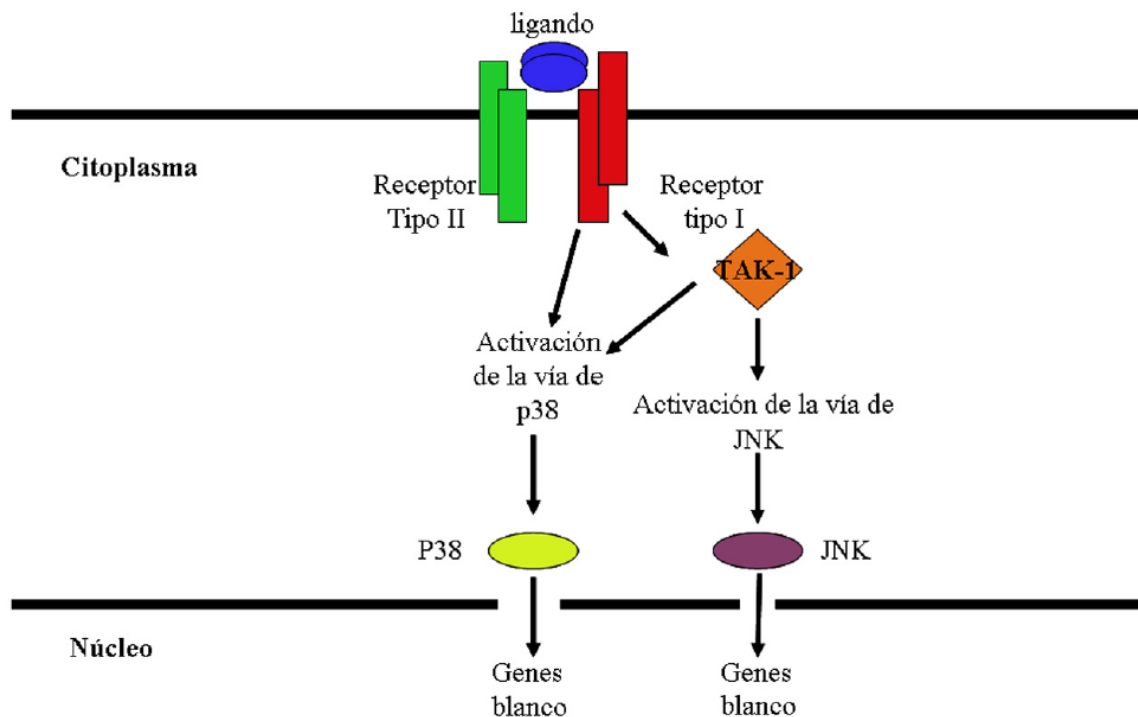


Figura 4. Las BMPs transducen su señal por otras vías que no dependen de las Smads. Una vez activado el receptor de BMPs ocurre la activación de las MAPK. Se ha observado que la vía p38 y JNK es activada por TAK-1, un sustrato directo del receptor tipo I. Aunque también la vía de p38 es activada directamente por los receptores de BMPs. Estas vías están involucradas en la apoptosis de varios tejidos.

La expresión de antagonistas de las BMPs controlan la apoptosis interdigital

Recientemente, se han reconocido un gran número de antagonistas que regulan temporal y espacialmente la distribución de las BMPs a nivel extracelular en la extremidad en desarrollo, impidiendo la unión de estos factores con sus receptores. Este control de las BMPs es muy importante durante el desarrollo de la extremidad, ya que impide que se presenten malformaciones de ésta, tales como el sobre-crecimiento del cartílago o una expansión en la apoptosis. Noggin, gremlin, DAN, cordina y follistatina son proteínas antagonistas de BMPs que regulan la disponibilidad de BMPs durante el desarrollo de la extremidad. Por ejemplo, el gen *noggin* se expresa en las condensaciones del cartílago y regula el tamaño y la forma del esqueleto [19], cordina regula la formación de las articulaciones [46], follistatina está involucrada en la diferenciación del músculo y tendones [47] y gremlin en la extensión de la AER y en la regresión del interdígito [20]. Estas observaciones indican que la función de las BMPs está regulada específicamente por los diferentes antagonistas y que éstos actúan de una manera complementaria y no redundante.

El ácido retinoico induce la apoptosis interdigital a través de las BMPs

El ácido retinoico, derivado de la vitamina A, es una molécula importante en la inducción de la apoptosis interdigital ya que al administrar un exceso de ácido retinoico en el interdígito se observa aceleración de la apoptosis (Figura 2C). Además, la aplicación del ácido retinoico en la punta del dedo lleva a un truncamiento en el desarrollo de este, debido a que es capaz de disparar la apoptosis en las células condrogénicas que lo constituyen (Figura 2E) [48]. Por otro lado, la eliminación de los receptores del ácido retinoico resulta en sindactilia, como consecuencia de inhibir la apoptosis [49]. En el ratón mutante *Hammertoe* la apoptosis interdigital es inhibida, y la administración de ácido retinoico en hembras preñadas rescata el fenotipo [50]. Esto sugiere que el ácido retinoico es promotor de la apoptosis interdigital. Sin embargo, en embriones de pollo en presencia de un antagonista de BMPs es inhibido el efecto inductor de la apoptosis por el ácido retinoico, sugiriendo que el control de éste sobre la apoptosis está mediado por las BMP [48].

Interrelación entre los FGFs y las BMPs durante el control de la apoptosis

El crecimiento de la extremidad en dirección próximo-distal por acción de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) está estrechamente relacionado con el control de la muerte celular en los interdígitos. El FGF8 es un factor presente en AER, al anular su expresión durante las etapas en las que está ocurriendo el crecimiento de la extremidad se observa truncamiento de ésta, asociada a la presencia de apoptosis masiva, sugiriendo un papel para FGF8 en la sobrevivencia celular. Sin embargo, la aplicación de FGFs en zonas interdigitales promueve dos efectos sobre los interdígitos; el primero a corto tiempo, en que la apoptosis es inhibida durante las primeras 10-12 h y el segundo a largo tiempo, en el que la apoptosis es inducida después de 20 h. Este efecto sobre la muerte celular de FGF es inhibida por la presencia de antagonistas de la señalización de BMPs. Por otro lado, la inhibición de la señalización de FGFs bloquea la apoptosis inducida por BMPs. Estos datos sugieren que los FGFs, por un lado, promueven la sobrevivencia celular al inhibir la apoptosis a tiempos cortos y por otro lado, hace a las células sensibles a la apoptosis inducida por BMPs [51]. Así mismo, en una clara interrelación entre las BMPs y los FGFs durante la apoptosis interdigital, se sabe que las BMPs inducen la expresión del receptor tipo 3 de los FGFs (FGFR3) en el interdígito [51].

Otros factores que participan en el control de la apoptosis interdigital

Además de las BMPs, se ha observado que la señalización del tipo de *Wingless int-related protein (Wnt)* tiene una participación importante en el control de la apoptosis interdigital. El ratón KO de *dkk1*, que codifica para un antagonista de WNT, genera polidactilias y sindactilias, lo que sugiere que la señalización WNT controla negativamente la apoptosis interdigital. Durante el desarrollo de la extremidad, la expresión de *Dkk-1* coincide con las zonas necróticas anterior y posterior, y con las zonas interdigitales donde ocurre la muerte celular programada (Figura 1A-D; 1G,H). Al parecer existe un balance entre *Dkk-1* y el señalamiento de BMPs que regula la muerte celular programada y la forma de la extremidad. Por un lado *Bmp2* induce la expresión de *Dkk*, mientras que la sobre-expresión de *Dkk-1* regula negativamente la

expresión de *Bmp2* en las células del mesénquima y de la cresta ectodérmica apical [52]. De igual manera, el ácido retinoico induce la expresión de *Dkk* en el interdígito (Figura 2F)

En conclusión, la apoptosis que moldea la forma de la extremidad depende del balance fino de señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. En nuestro laboratorio nos hemos enfocado a estudiar los mecanismos moleculares que conllevan a la morfogénesis de las extremidades y en particular a la formación de la mano. Las señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que controlan la presencia o ausencia de los interdígitos están coordinadas con las señales condrogénicas que regulan la formación de los dedos y la forma de éstos.

Referencias

1. Hinchliffe, J.R. y Ede, D.A. (1967). Limb development in the polydactylous *talpid3* mutant of the fowl. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 17: 385-404.
2. Hinchliffe, J.R. y Ede, D.A. (1973). Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless (*ws*) chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30: 753-772.
3. Hinchliffe, J.R. y Thorogood, P.V. (1974). Genetic inhibition of mesenchymal death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of *talpid3* (*ta3*) mutante chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31: 747-760.
4. Pautou, M.P. (1975). Morphogenesis of the chick embryo foot. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34: 511-529.
5. Fallon, J.F. y Cameron, J. (1977). Interdigital cell death during limb development of turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 40: 285-289.
6. Milaire, J. (1977). Histochemical expression of morphogenetic gradients during limb morphogenesis. *Birth defects: original article series.* 13: 37-67.
7. Kelley, R.O. (1970). An electron microscopic study of mesenchyme during development of interdigital spaces in man. *Anat. Rec.* 168: 43-53.
8. Saunders, J.W. y Fallon, J.F. Cell death in morphogenesis. In: Locke M, editor. *Major problems in developmental biology.* New York: Academic Press; 1967. p. 289-314.
9. Saunders Jr. J.W. (1972). Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. *Ann. NY Acad. Sci.* 193: 29-42.
10. Seto, M.L., Nunes, M.E., MacArthur, C.A., Cunningham, M.L. (1997) Pathogenesis of ectrodactyly in the dactylaplasia mouse: aberrant cell death of the apical ectodermal ridge. *Teratology.* 56: 262-270.
11. Raynaud A. Developmental mechanism involved in the embryonic reduction of limbs in reptiles. (1990) *Int. J. Dev Biol.* 34: 233-243.
12. Klein, K.L., Scott, W.J., Wilson, J.G. (1981). Aspirin-induced teratogenesis: a unique pattern of cell death and subsequent polydactyly in the rat. *J. Exp. Zool.* 216: 107-112.
13. Hogan, B.L.M. (1996). Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10: 1580-1594.
14. Macias, D., Gañan, Y., Sampath, T.K., Piedra, M.E., Ros, M.A., Hurlé, J.M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124: 1109-1117.
15. Zuzarte-Luís, V., Montero J. A., Rodríguez-Léon J., Merino, R., Rodríguez -Rey, J.C. y Hurlé J. M. (2004). A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev. Biol.* 272 (1): 39-52.
16. Laufer, E., Pizette, S., Zou, H., Orozco, O. E., y Niswander, L. (1997). BMP expression in duck interdigital webbing: A reanalysis. *Science* 278, 305.
17. Gañan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A. y Hurlé, J.M. (1996). Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development.* 122: 2349-2357.
18. Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. y Kuroiwa A. (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development.* 122: 3725-3734.
19. Merino, R., Gañan, Y., Macias, D., Economides, A.N., Sampath, K.T. y Hurlé, J.M. (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFβs, and Noggin through BMP signaling. *Dev. Biol.* 200: 35-45.

20. Merino, R., Rodríguez-León, J., Macias, D., Gañan, Y., Economices, A.N. y Hurle, J.M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, condrogénesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*. 126: 5515-5522.
21. Hofmann, C., Lou, G., Balling, R., Karsenty, G. (1996). Analysis of limb patterning in BMP-7 deficient mice. *Dev. Genet.* 19(1): 43-50.
22. Kawabata, M., Imamura, T., y Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9: 49-61.
23. Massagué, J. (1998). TGF β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791.
24. Moustakas, A. y Heldin, C. H. (2002) From mono- to oligo- Smads: the heart of the matter in TGF β signal transduction. *Genes Dev.* 16: 67-871.
25. Heldin, C.-H., Miyazono, K., y ten Dijke, P. (1997). TGF β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390: 465-471.
26. Miyazono, K, Ten Dijke, P. y Heldin, C.-H. (2000). TGF β signaling by Smad proteins. *Adv. Immun.* 75: 115-154.
27. Wieser, R., Wrana, J.L., y Massagué, J. (1995). GS domain mutations that constitutively active T β R-I, the downstream signaling component in the TGF β receptor complex. *EMBO J.* 14: 2199-2208.
28. Zou, H. y Niswander, L.(1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science.* 272:738-741.
29. Koenig, B.B., Cook, J.S, Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., Grant, R.A., *et al.* (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5961-5974.
30. Ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L, Ichijo, H., Heldin, C.-H., y Miyazono, K. (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 269: 16985-16988.
31. Macias-Silva, M., Hoodless, P.A., Tang, S.J., Buchwald, M. y Wrana, J.L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* 273: 25628-25636.
32. Feng, X.-H. y Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor β (TGF β) type I receptor determines the TGF β intracellular signaling specificity. *EMBO J.* 16, 3912-3923.
33. Chen, Y.G., y Massagué, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor β family receptors. *J. Biol. Chem.* 274: 3672-3677.
34. Hoodless, P.A., Haerry, T., Abdollah, S. Stapleton, M., O'Connor, M.B, Attisano, L.y Wrana, J.L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell.* 85, 489-500.
35. Chen, Y., Bhushan A, y Vale, W. (1997). Smad8 mediates the signaling of the receptor serine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12938-12943.
36. Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R. y Yoneda, T. (1998). Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J. Biol. Chem.* 273: 1872-1879.
37. Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J.-I., Kawabata, M. Y Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF β superfamily. *Nature.* 389: 622-626.
38. Hayashi, H., Abdollah, S., Qui, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbone, M. A., Jr., Wrana, J. L., y Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as antagonist of TGF β signaling. *Cell.* 89: 1165-1173.
39. Hata, A., Lagna, G., Massagué, J., y Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 12, 186-197.
40. Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. y Matsumoto, K. (1999). P38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor β superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2322-2329.
41. Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. y Taga, T. (2000) BMP-2 induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J. Biol. Chem.* 275: 1764-17652.
42. Derynck, R. y Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature.* 425: 577-584.
43. Zou, H., Wieser, R., Masagué, J. y Niswander, L. (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11: 2191-2203.
44. Zhang, D., Schwarz, E. M., Rosier, R. N., Zuscik, M. J., Puzas, J. E. y O'keefe, R. J. (2003). ALK2 Functions as a BMP type I receptor and induces Indian Hedgehog in chondrocytes during skeletal development. *J. Bone and Miner. Res.* 18:1593-1604.
45. Chimal-Monroy, J., Rodríguez-León, J., Montero, J.A., Gañan, Y., Macias, D., Merino, R. y Hurle, J.M. (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* 257: 292-301.

46. Francis-West, P. H., Parish, J., Lee, K. y Archer, C (1999). BMP/GDF- signaling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res.* 296, 111-119.
47. Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Rodríguez-León, J., Economides, A., Rodríguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C. y Hurler, J. M. (1999). Control of digit formation by activin signaling. *Development.* 126: 2161-2170.
48. Rodríguez-León J, Merino R, Macias D, Gañan Y, Santaesteban E, y Hurler J. (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat. Cell. Biol.* 1: 125-126.
49. Dupé V, Ghyselinck NB, Tomás V, Nagy L, Davies PJA, Chambon P, Mark M. (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP7 expression in Mouse autopods. *Dev. Biol.* 208:30-43.
50. Ahuja HS, James W, y Zakeri, Z. (1997). Rescue of the limb deformity in hammetoe mutant mice by retinoic acid-induced cell death. *Dev. Dyn.* 208: 466-481.
51. Montero, J. A. Gañan, Y. Macias, D. Rodríguez-León, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M.A., y Hurler, J.M. (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development.* 128: 2075-2084.
52. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Concepción RE, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang PS, Niehrs Ch, Izpisúa BJC, Westphal H. (2001) Dickkopf1 Is Required for Embryonic Head Induction and Limb Morphogenesis in the Mouse. *Dev. Cell.* 1: 423-434.

CONTROL MOLECULAR DE LA APOPTOSIS DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LA EXTREMIDAD

Resumen

La extremidad embrionaria del pollo es un modelo excelente para analizar los mecanismos moleculares que regulan la muerte celular programada o apoptosis. Durante la formación de la extremidad existen cuatro zonas apoptóticas que controlan la morfogénesis correcta de la extremidad. La más extensa de las zonas apoptóticas es la zona interdigital. Aquí las señales moleculares que controlan este proceso pertenecen a la familia de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), estas moléculas se unen a sus receptores y transducen la señal a través de las proteínas Smad. La actividad pro-apoptótica de BMPs requiere la interacción con otras moléculas de señalización como lo son las señales de la familia los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), llamada en inglés Wingless int-related protein (WNT) y el ácido retinoico. Los FGFs, WNT y el ácido retinoico a su vez modulan la capacidad de las BMPs para inducir la apoptosis en los interdígitos.

Palabras clave: Apoptosis, Proteínas Morfogénicas del Hueso (BMPs), morfogénesis de la extremidad, Ácido Retinoico, Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs).

Semblanza del Dr. Jesús Chimal Monroy.

Nació en la Ciudad de México el 19 de enero de 1964. Estudió la carrera de Biólogo en la Facultad de Ciencias de la UNAM. En esta misma Facultad obtuvo la Maestría en Ciencias en la especialidad de Biología Celular y obtuvo su grado de Doctor en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Realizó una estancia Postdoctoral en la Universidad de Cantabria, España en el laboratorio del Dr. Juan Hurlé. Actualmente es investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas al cual ingresó en 1997. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1. Su línea de Investigación está centrada a entender los mecanismos moleculares que controlan la formación de los dedos durante la morfogénesis de la mano en el embrión. Sus trabajos han sido publicados en revistas especializadas sobre biología del desarrollo, como lo son *Development*, *Developmental Biology*, *Developmental Dynamics* etc. Es miembro de las siguientes sociedades científicas; Society for Developmental Biology, International Society of Differentiation, International Society for Matrix Biology, American Society for Matrix Biology y American Association of Anatomists.