

MECANISMOS MOLECULARES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DE LA EXTREMIDAD DE LOS VERTEBRADOS

**René Fernando Abarca-Buis, David Garciadiego-Cázares
y Jesús Chimal-Monroy***

*Depto. de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
C.U., Apdo. Postal 70228, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: *jchimal@servidor.unam.mx*

RESUMEN

¿Cómo un grupo de células indiferenciadas pueden formar estructuras y tejidos altamente organizados y diferenciados?, ¿Cuál es la naturaleza de las señales que dictan estos eventos? ¿Cómo son los procesos del desarrollo que actúan para que las diferentes especies desarrollen estructuras similares pero adaptadas al medio en el que viven?

Uno de los modelos que han permitido responder en parte a estas interrogantes es la extremidad embrionaria. A partir de los estudios en la extremidad embrionaria se han propuesto una serie de interesantes paradigmas que han cambiado la percepción de ver a los procesos del desarrollo como aislados y poco dinámicos. En esta revisión, destacamos aquellos estudios que han contribuido de manera amplia a entender la inducción de la formación de la extremidad y el establecimiento de los centros organizadores que controlan su morfogénesis, así como el patrón esquelético que incluye la diferenciación del cartílago y la muerte celular.

Palabras Clave: *AER, condrogénesis, extremidad embrionaria, identidad de los dedos, identidad de la extremidad, muerte celular programada, zona de progreso, ZPA.*

ABSTRACT

How can a group of undifferentiated cells develop into complex structures and highly organized and differentiated tissues? What is the nature of the signals that dictate these events? Which developmental processes act so that different species can develop similar structures adapted to the environment where they live? A model that partly answers these questions is the embryonic limb. Limb bud studies have suggested interesting paradigms that have changed the perception of development as an isolated and not very dynamic process. The present work reviews the studies that have led to understand the induction of the limb bud and the establishment of the organizing centers that control limb morphogenesis, as well as the skeletal pattern that includes cartilage differentiation and cell death.

Key Words: *AER, chondrogenesis, limb bud, digit identity, limb identity, programmed cell death, progress zone, ZPA.*

INTRODUCCIÓN

Abservar a las extremidades de las diversas especies de vertebrados, es sorprendente encontrar que dichas estructuras están adaptadas al hábitat en el que se desarrolla cada especie. Cada extremidad tiene forma distinta, por ejemplo, al comparar nuestras extremidades con las del ave, el murciélago, el cocodrilo, la ballena o el caballo, las diferencias entre ellas son evidentes (Figura 1). Sin embargo, si

observamos a las extremidades de estas mismas especies, pero en etapas tempranas del desarrollo embrionario, es imposible distinguir unas de otras. Es hasta etapas posteriores del desarrollo cuando se pueden notar las diferencias entre estas extremidades y podemos distinguir a qué especie pertenecen. Otra característica importante que observamos en el desarrollo embrionario de los vertebrados es que las extremidades siempre se forman en una posición precisa y en igual número; dos extremidades anteriores y dos extremidades posteriores siempre opuestas una a la otra con respecto a la línea media del embrión

Nota: Artículo recibido el 07 de noviembre de 2006 y aceptado el 29 de noviembre de 2006.

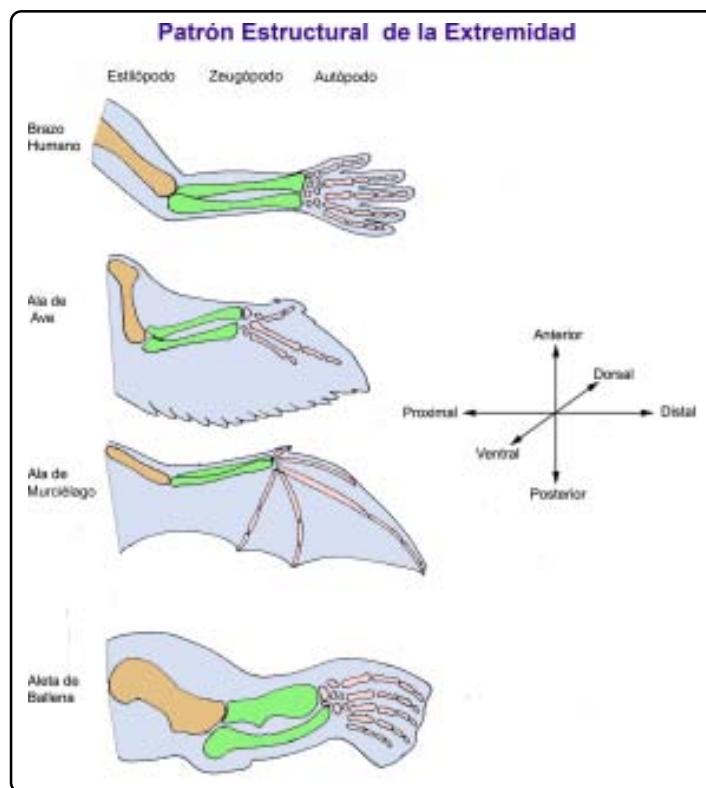


Figura 1. Patrón esquelético de la extremidad en los vertebrados: homología de estructuras de las extremidades anteriores del humano, ave, murciélago y ballena. Todas las extremidades derivan de un antecesor tetrápodo común. Aunque las adaptaciones de las extremidades al trabajo, vuelo y nado evolucionaron independientemente, todas ellas presentan un patrón esquelético básico, conformado por un estilopodo, zeugopodo y autopodo, ubicados similarmente en los ejes antero-posterior, proximal-distal y dorso-ventral de los vertebrados.

(Figura 2a). En las serpientes, que bien sabemos carecen de ellas, se forman primordios de extremidad que después desaparecen, debido a que las señales que controlan el crecimiento del primordio no se expresan y por consiguiente, nunca se forman extremidades funcionales¹.

De manera simple, todas las extremidades embrionarias están formadas por un grupo de células de mesénquima, envueltas por células llamadas ectodermo. El mesénquima dará origen al esqueleto, al músculo, a los ligamentos y a los tendones, mientras que el ectodermo a la piel y a sus derivados. Sin embargo, aunque a simple vista observamos una estructura homogénea de células de mesodermo envueltas por células de ectodermo, existen poblaciones celulares organizadas en ciertas áreas en el primordio que secretan señales moleculares encargadas de establecer patrones espaciales. Un patrón espacial se refiere a la organización de las células en un determinado tiempo y espacio durante el desarrollo embrionario que resulta en la formación correcta y por lo tanto funcional de un tejido u órgano. El establecimiento de los patrones espaciales está estrechamente relacionado a la morfogénesis, que es el proceso por el cual un tejido en desarrollo cambia de forma hasta alcanzar una organización anatómica/funcional². La formación del esqueleto apendicular (esqueleto que se desarrolla en las extremidades) es un parámetro importante para identificar el desarrollo de la extremidad. Así, tenemos que las extremidades anteriores como las alas, patas delanteras, aletas pectorales o nuestros brazos están compuestas, en la parte más proximal al tronco del cuerpo, por un elemento esquelético, el húmero, dos elementos esqueléticos, el radio y la ulna en la parte

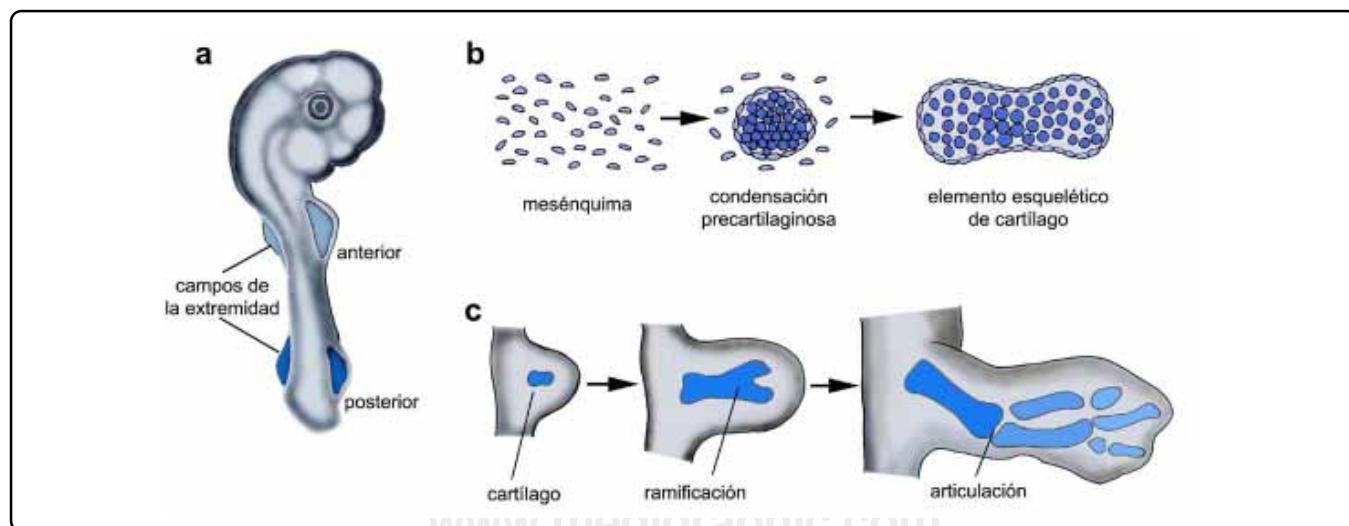


Figura 2. Formación del Esqueleto Apendicular. a.- Las extremidades se desarrollan en puntos muy específicos del eje antero-posterior del cuerpo, a estos sitios se les conoce como campos de la extremidad. b.- La formación del esqueleto inicia con la condensación de células mesenquimáticas que se diferencian a cartílago dando origen a los moldes del esqueleto cartilaginoso. c.- El cartílago crece y se ramifica. Durante este proceso, se forman las articulaciones que segmentan al molde inicial de cartílago que dará origen a los diversos elementos esqueléticos de la extremidad.

media y por un número variable en la parte más distal; los carpos y los dedos. Esta última zona varía en número dependiendo de las especies, por ejemplo, el caballo tiene un solo dedo, las aves tienen tres y los humanos cinco. En las extremidades posteriores como las patas, aletas pélvicas o nuestras piernas se sigue un mismo patrón básico que en las anteriores; un elemento esquelético proximal, dos medios y un número variable en la parte distal³ (Figura 1). La formación del esqueleto apendicular es muy peculiar, se forma un esbozo o molde cartilaginoso del elemento esquelético que posteriormente se reemplazará por hueso. La formación de los huesos de la extremidad depende necesariamente de la diferenciación del cartílago o condrogénesis. La condrogénesis en la extremidad empieza con la agregación o condensación de células mesenquimatosas que adquirirán gradualmente un ambiente y fenotipo cartilaginoso hasta evidenciar características netamente cartilaginosas (Fig. 2b). Simultáneamente a este proceso, la morfogénesis de la condensación inicial resultará en los elementos esqueléticos que comprende a la extremidad ya formada. La diferenciación del cartílago en el primordio de la extremidad sigue una secuencia en dirección proximal a la dirección distal. En primer lugar se forma el elemento del estilópodo (húmero/fémur), entonces el primordio del cartílago se bifurca para formar al zeugópodo (radio-ulna/tibia-ulna) y finalmente se ramifican para formar al autópodo (carpos/dedos de la mano o tarsos/dedos de los pies) (Figura 2c)^{3,4}.

En esta revisión describiremos los mecanismos moleculares que controlan a la morfogénesis de las extremidades.

INDUCCIÓN DE LA EXTREMIDAD

Las extremidades se forman en sitios bien precisos, por ejemplo, en el embrión del pollo, los primordios de la extremidad anterior, en donde se forman las alas, se posicionan adyacentes a las somitas 15 a 20, y entre las somitas 26 y 30 se establece el primordio de la extremidad posterior que formará a las patas. La formación de la extremidad inicia con el surgimiento de un pequeño brote a los costados del cuerpo del embrión. Se ha propuesto que señales provenientes del mesodermo intermedio inducen la formación de las extremidades estimulando primero a las células del mesodermo de la placa lateral que a su vez inducirán al ectodermo más distal del primordio a producir señales que iniciarán el crecimiento de la extremidad⁵.

Los experimentos clásicos de Harrison⁶ mostraron que el transplante del mesodermo de la región presuntiva de la extremidad (campo de la extremidad), a un sitio ectópico como lo es la región dorsal o interapendicular origina una nueva extremidad, mientras que el transplante del ectodermo o del mesodermo no perteneciente al campo de la extremidad no tiene efecto alguno. Balinsky⁷ mostró que el implante de un esbozo nasal en el flanco del embrión entre la extremidad anterior y la posterior es capaz de formar extremidades ectópicas. Ahora sabemos que esta estructura secreta a los mismos factores que

promueven la formación de la extremidad⁸. Stephens y McNulty⁹ bloquearon con barreras impermeables la comunicación entre el mesodermo intermedio y la placa lateral del mesodermo en embriones de pollo en los estadios 13 y 15 de desarrollo, resultando en la inhibición del desarrollo de la extremidad, lo que sugiere que existe alguna señal proveniente del mesodermo intermedio que actúa sobre el mesodermo de la placa lateral para inducir la formación de la extremidad. Aunque estos experimentos identificaron las áreas del embrión en donde se formaron las extremidades y demostraron la capacidad inductiva del mesodermo intermedio, no mostraron la naturaleza molecular del inductor.

En las etapas de desarrollo previas a la formación de la extremidad se observó que dos grupos de factores de crecimiento, unos pertenecientes a la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y otros a la familia Wingless (WNT), se expresan en el mesodermo intermedio y actúan como inductores endógenos de la extremidad¹⁰. La expresión de *Fgf8* se observa en el mesodermo intermedio y al implantar perlas de heparina de 100-150 μm que liberan FGF-8 son capaces de inducir la formación de extremidades ectópicas en el flanco del embrión¹¹. Lo mismo ocurre con la aplicación de los FGF-1, FGF-2 y FGF-4, sin embargo estas moléculas no se expresan en el mesodermo intermedio, tal como *Fgf8*, por lo que se descartan como los inductores endógenos de la formación de las extremidades⁸.

Otra señal involucrada en la inducción de la extremidades *Wnt2b* que al igual que FGF-8 se expresa en el mesodermo intermedio y en la placa lateral del mesodermo del campo de la extremidad anterior en el embrión de pollo. Otro gen de la misma familia, *Wnt8c*, se expresa en la placa lateral del mesodermo de la extremidad posterior. Ambos genes son capaces de inducir la formación de extremidades ectópicas al igual que FGF-8 y esto correlaciona con la inducción del gen *Fgf10* en la placa lateral del mesodermo. Si se inhibe la función de las señales WNT no ocurre la expresión de *Fgf10* y no hay formación de las extremidades¹². Estos datos nos muestran que existen distintas moléculas de la familia WNT que se expresan diferencialmente en los campos embrionarios de las extremidades y que están involucradas en la formación de éstas, induciendo la expresión del gen *Fgf10*. Aunado a lo anterior se ha demostrado que FGF-10 está involucrado en la formación de las extremidades ya que es capaz de inducirlas ectópicamente en el embrión de pollo, mientras que en el ratón deficiente de este gen no las forma. De estos resultados se demuestra que FGF-10 pertenece a la cascada molecular que induce a la formación de las extremidades^{13,14}.

¿PIERNAS O BRAZOS?

Al iniciar el desarrollo de las extremidades no existen diferencias entre las extremidades anteriores y las posteriores. Sin embargo, la morfología final de ambas extremidades es distinta. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que controlan la formación de piernas o brazos?

Hamburger en 1938¹⁵ hizo transplantes de prospectivas extremidades y encontró que cuando se transplantaba mesodermo del campo de ala en el flanco del embrión siempre se formarían alas. Por el contrario, si se implantaba mesodermo del campo de la pata siempre formarían patas. Esto sugiere que desde etapas tempranas se establecen las señales que determinarán qué tipo de extremidad se formará. ¿Cuáles son esos factores? Se sabe que un grupo de genes que codifican para factores de transcripción, proteínas que controlan la transcripción de los genes, pertenecientes a la familia de Brachury llamados T-box (caja-T; Tbx) regulan la identidad de las extremidades. Se ha observado que el factor PITX1 un factor de transcripción con dominio Hox y relacionado a la familia Bicoid se expresa y especifica la morfogénesis de la extremidad posterior. La eliminación del gen *Pitx1* en ratones lleva a que las extremidades posteriores adquieran una morfología parecida a extremidades anteriores^{16,17}. Adicionalmente *Tbx5* se expresa de manera exclusiva en la extremidad anterior. En la extremidad posterior se expresa el gen *Tbx4*¹⁸. Al sobre-expresar estos genes de manera ectópica en el embrión de pollo se cambia la identidad de las extremidades, es decir, al sobre-expresar a *Tbx5* en el campo de la extremidad posterior, en lugar de formarse una pata como debería ocurrir, se forma un ala. Por el contrario, si se sobreexpresa el gen *Tbx4* en el campo del ala, en lugar de formarse un ala se formará una pata. Por otro lado, si se sobreexpresa el gen *Tbx5* en la parte lateral del embrión entre las dos extremidades y se implanta una perla de FGF-8 para inducir una extremidad ectópica, siempre se induce la formación de un ala. De igual manera la sobreexpresión de *Tbx4* y la implantación de FGF-8 siempre inducen la formación de patas¹⁹⁻²¹. Además se requiere de *Pitx1* para que *Tbx4* se exprese. Aunque es claro el papel de *Tbx5* y *Tbx4* en la identidad de las extremidades del pollo, en el ratón se sugiere que participan en la formación y en el crecimiento de la extremidad²². En el ratón *Tbx5* induce la expresión del gen *Wnt2b* en el mesodermo intermedio y en el mesodermo de la placa lateral del campo de la extremidad anterior, mientras que induce la expresión de *Wnt8c* en la placa lateral del mesodermo de la extremidad posterior. En ambos casos se induce la expresión de *Fgf10* que resulta en la inducción de la extremidad²².

CRECIMIENTO PRÓXIMO-DISTAL

Una vez que la extremidad se ha establecido, ésta prosigue su crecimiento en una dirección **próximo-distal**. Las señales que promueven la formación de la extremidad también están involucradas en el crecimiento de la extremidad. FGF-10, que se expresa en la placa lateral del mesodermo y que depende de la expresión de *Tbx5* y *Wnt2b* en la extremidad anterior y de *Tbx4* y *Wnt8c* en la extremidad posterior, induce la expresión de FGF-8 en el ectodermo distal de la extremidad, resultando en la formación de un epitelio pseudoestratificado y por tanto engrosado. Cuando el ectodermo adquiere esta característica histológica se le denomina AER (Cresta ectodérmica apical) (Figura 3)¹².

La importancia de esta estructura se evidenció cuando el Dr. John Saunders en 1948²³ retiró a la AER en distintas etapas del



Figura 3. Las polaridades en la extremidad son dirigidas por tres centros organizadores. La AER, la ZPA y el ectodermo dorsal y ventral. Una de las moléculas que dirigen el establecimiento del eje próximo-distal, *Fgf8*, se expresa en la AER (izquierda). *Shh* se expresa en la ZPA y dirige la formación del eje antero-posterior. *Wnt7a* se expresa en el ectodermo dorsal y participa en el establecimiento del dorso de la extremidad.

desarrollo del pollo, si la AER es eliminada temprano en el desarrollo, el crecimiento de la extremidad se trunca en su totalidad, mientras que la eliminación en etapas posteriores genera la formación de estructuras proximales (húmero/fémur) y medias (radio/ulna, tibia/fíbula), pero no distales (los dedos no se forman), es decir, el nivel de truncamiento de la extremidad a lo largo de su eje próximo-distal dependía de la etapa de desarrollo en que la AER se retiraba. Estos experimentos demuestran que la AER dirige el crecimiento y establece la polaridad próximo-distal de la extremidad. Una vez considerada la importancia de este centro de señalización se reconocieron a las moléculas secretadas por la AER que promueven el crecimiento de la extremidad en una secuencia próximo-distal.

Se ha determinado la expresión de muchos genes en la AER, sin embargo, sólo aquéllos pertenecientes a la familia de los FGF son capaces de rescatar el crecimiento de la extremidad cuando la AER es eliminada. Los miembros que se expresan en esta estructura son *Fgf2*, *Fgf4*, *Fgf8*, *Fgf9* y *Fgf17*. De éstos, por sus numerosos estudios e importancia hay que resaltar a *Fgf4* y *Fgf8*. *Fgf4* se localiza en la región posterior de la AER, mientras que *Fgf8* se expresa a todo lo largo de la AER (Figura 3). El truncamiento de la extremidad generado cuando la AER es eliminada, puede rescatarse cuando se aplican esferas de heparina recubiertas con FGF-2, FGF-4 y FGF-8 en el mesénquima posterior distal, es decir; se logra que la extremidad continúe y finalice su desarrollo^{11-13,24,25}. Ratones knockout de FGF-8 resultan en la hipoplasia de los elementos esqueléticos y una expresión mantenida de *fgf4*, lo que sugiere que FGF-4 puede compensar la pérdida de *fgf8*, explicando por qué el ratón, aunque pequeña, aún desarrolló su extremidad²⁶. Ésto es comprobado por la generación del doble mutante de *fgf8* y *fgf4*, cuyo resultado es el truncamiento de las extremidades²⁷.

Todos estos datos muestran que estos factores son mediadores importantes de la función de la AER, pero ¿cuál es el mecanismo

por el cual los FGF controlan el crecimiento de la extremidad? Se ha propuesto que los FGF son señales de sobrevivencia y proliferación que recaen en un grupo de células del mesodermo subyacente a la AER. Cuando la AER es removida o es eliminada la expresión y acción de *Fgf4* y *Fgf8* en la AER, ocurre una reducción importante en la tasa de proliferación celular e incremento de la muerte celular en las células subyacentes a la AER, provocando que el desarrollo futuro de la extremidad se interrumpa²⁷.

Es importante reiterar que el crecimiento próximo-distal de la extremidad está asociada con el establecimiento de los elementos esqueléticos en donde se forma primero el estilópodo, luego el zeugópodo y finalmente el autópodo, siguiendo una secuencia proximal a distal, pero ¿de dónde provienen y cómo se organizan estos elementos? Existen dos hipótesis o modelos que explican el establecimiento de los elementos esqueléticos con base en su orden de aparición.

El modelo de la zona de progreso considera la existencia de un grupo celular subyacente a la AER, a las que se les denomina células de la zona de progreso. Estas células reciben señales de la AER encargadas de mantenerlas en un estado proliferativo e indiferenciado. La influencia de la AER se limita únicamente a la zona de progreso, por lo tanto, cuando algunas células son excluidas de esta zona por la constante proliferación, inician su diferenciación a condrocitos adquiriendo nuevas informaciones espacio-temporales que resultan en el establecimiento del patrón esquelético. Así, aquellas células que reciben por menor tiempo esas señales adquieren destinos proximales. Por el contrario, si las células reciben esas señales por mayor tiempo adquieren destinos distales^{28,29}.

Un segundo modelo denominado de la pre-especificación propone que el mesénquima del primordio de la extremidad desde etapas muy tempranas está estratificado con poblaciones precursoras de las tres distintas regiones de la extremidad; estilópodo, zeugópodo y autópodo. Al avanzar el desarrollo de la extremidad ocurre la expansión de la población celular que permite evidenciar a los elementos esqueléticos³⁰. Actualmente en la literatura existe controversia respecto a la validez de cada modelo.

POLARIDAD DORSO-VENTRAL

Al observar nuestras manos o pies es evidente que existe asimetría, en el caso de las manos representada en el dorso por la presencia de las uñas y los nudillos, y en la parte ventral por la presencia de las palmas. ¿Cómo se establecen estas diferencias durante el desarrollo de la extremidad? ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que especifican la polaridad dorso-ventral? Se sabe por los trabajos clásicos de MacCabe³¹ en embriones de pollo que la polaridad **dorso-ventral** está controlada por el ectodermo, ya que al rotar 180° al ectodermo que recubre al primordio de la extremidad se obtiene que la extremidad resultante muestra invertida la polaridad dorso-ventral. Un gen que se expresa de

manera característica en el ectodermo dorsal de la extremidad es *Wnt7a* (Figura 3). La eliminación de este gen en el embrión de ratón genera la formación de extremidades bi-ventrales, es decir, las estructuras dorsales, tanto en el ectodermo como en el mesodermo se transforman en estructuras ventrales³². Esto sugiere fuertemente que *Wnt7a* en el ectodermo dorsal controla el establecimiento de la región dorsal de la extremidad. Pero si este gen se expresa en el ectodermo, ¿cómo es que controla la formación de las estructuras dorsales de origen mesodérmico? Se sabe que el gen *Lmx1b* que codifica para un factor de transcripción y que se expresa exclusivamente en el mesodermo dorsal es regulado por la presencia de *Wnt7a* en el ectodermo. Al igual que la ausencia de *Wnt7a* lleva a que *Lmx1b* no se exprese dorsalmente, la eliminación de este gen genera extremidades bi-ventrales^{33,34}. Si existe una señal que controla la formación de las estructuras dorsales, nos hace suponer la existencia de señales que controlan la formación de las estructuras ventrales. En el ectodermo ventral se ha observado la expresión del gen *Engrailed-1* (*En1*), que codifica para un factor de transcripción, y del receptor tipo 1a de las BMP (*Bmpr1a*)³⁵⁻³⁶. La eliminación de cualquiera de estos dos genes genera la formación de extremidades bi-dorsales, aunque en el caso de la eliminación de *Bmpr1a* se observa que *En1* no se expresa, sugiriendo que su expresión depende de la señal de BMP. De estos resultados surge la siguiente pregunta, ¿por qué si se eliminan a los genes o de la región dorsal o a los de la región ventral se forman estructuras bi-ventrales o bi-dorsales respectivamente? Los análisis de estos ratones han mostrado que al eliminar a *Wnt7a* ocurre la expresión de *En1* o *Bmpr1a* en el ectodermo dorsal, de manera que se dirige la formación de las estructuras ventrales. Por el contrario, al eliminar a *En1* o *Bmpr1a* ocurre la expresión ectópica de *Wnt7a* en el ectodermo ventral y de *Lmx1b* en el mesodermo ventral resultando en extremidades bi-dorsales. De igual manera, al sobreexpresar al gen *Wnt7a* en el ectodermo ventral se inhibe la expresión de *En1* y se generan extremidades bi-dorsales. A su vez cuando *En1* es sobre-expresado en el ectodermo dorsal se inhibe la expresión de *Wnt7a* y se forman extremidades bi-ventrales³⁵⁻³⁶. En ambos casos la polaridad se invierte. Estos experimentos nos indican que hay un sistema de regulación entre *Wnt7a* y *En1* que llevan al establecimiento correcto de la polaridad dorso-ventral de la extremidad.

Una observación importante de estos experimentos es que la posición de la AER se altera, ya que se ha observado que *En1* participa en este evento. El posicionamiento de la AER depende de la expresión del gen *Radical fringe (R-fng)* en el ectodermo dorsal antes de la aparición de la AER y que codifica para una enzima glicosiltransferasa. Su expresión es reprimida en la región ventral por *En1*, así, la AER se forma en la frontera de las células que expresan *R-fng* y las que no lo expresan. Cuando experimentalmente se induce la expresión ectópica de *En1* en la región dorsal se restringe la expresión de *R-fng* a una pequeña área dorsal que es en donde la AER se forma. De éste y otros experimentos se ha propuesto que el posicionamiento de la AER

y el establecimiento de la polaridad dorso-ventral están completamente asociadas.

POLARIDAD ANTERO-POSTERIOR

Durante el desarrollo de la extremidad no sólo se especifican los elementos esqueléticos en dirección próximo-distal, sino que además ocurre en una dirección anterior-posterior. Al observar nuestras manos evidenciamos de manera muy clara las diferencias entre cada uno de los dedos, el dedo pulgar o dedo “I” (uno) se ubica en la región anterior, mientras el dedo meñique o dedo “V” (cinco) en la región posterior. ¿Cuáles son las señales moleculares que controlan esta polaridad? En la región posterior de las extremidades embrionarias de los vertebrados existe una zona del mesodermo con actividad polarizante, capaz de dirigir y establecer la polaridad antero-posterior de la extremidad. Este descubrimiento fue hecho al transplantar este tejido mesodérmico del primordio de la extremidad anterior del pollo a la región anterior del primordio de la extremidad de un embrión hospedero, generando la duplicación del autópodo en imagen especular, es decir, el ala resultante presentó seis dedos en vez de tres, pero organizados en imagen especular con una organización IV,III,II,II,III,IV (el ala carece de dedo I) siendo el dedo cuatro en el ala normal el más posterior, el dedo tres el de en medio y el dos el anterior³⁷. A esta zona posterior del primordio de la extremidad se le denominó Zona de Actividad Polarizante ZPA (Figura 3). Posteriormente se descubrió a *Sonic hedgehog* (*Shh*) como el gen involucrado en el control de esta polaridad, ya que al implantar células que expresan *Shh* en la región anterior del primordio se indujo la duplicación del autópodo en imagen especular, de la misma manera que al transplantar a la ZPA³⁸. *Sonic hedgehog* induce la expresión de la proteína morfogenética del hueso-2 (*Bmp2*) en las células adyacentes, la cual actúa como una molécula de señalamiento secundaria, promoviendo la expresión de los genes homeóticos *Hoxd11* y *Hoxd13* en el mesénquima, así, estos genes están presentes en la cascada molecular inducida por *Shh* que permite el establecimiento de la polaridad antero-posterior de la extremidad³⁹.

Pero, ¿qué evita que *Shh* se exprese en la zona anterior o bien que restrinja su expresión en la región posterior? Sabemos que el ácido retinoico (AR), derivado de la vitamina A, induce el establecimiento de la ZPA. La aplicación de AR en la región anterior de la extremidad induce un fenotipo idéntico al observado cuando se transplanta la ZPA o SHH en la región anterior. El AR induce la expresión de *Hoxb8* y *dHand* que resulta en la aparición de *Shh* en la parte posterior del primordio⁴⁰. Por tanto, se hace relevante el determinar quién restringe la expresión de *Hoxb8* y *dHand* a la zona posterior. Se ha observado que la proteína GLI3 en su forma represora inhibe la expresión de *dHand* en la zona anterior, restringiéndola en la posterior. *Gli3* codifica para un factor de transcripción involucrado en la señalización de SHH, en ausencia de la señalización inducida por SHH, GLI3 es procesado proteolíticamente y se genera la forma represora (GLI3R) que inhibe la expresión de aquellos

genes promovidos por SHH. Por el contrario si la señalización de SHH se activa, GLI3 no se procesa y entonces actúa como una forma activadora (GLI3A)⁴¹. Al estar SHH presente en la zona posterior se genera un gradiente proteico que genera un balance de GLI3 en sus formas represora y activadora, donde GLI3R es mayoría en la zona anterior y GLI3A lo es en la posterior⁴². Así, la expresión de *dHand* inducida por el AR se restringe a la zona posterior y por lo tanto también la de *Shh*, pero antes de que ocurra la expresión de *Shh* la forma represora de GLI3 será la predominante en toda la extremidad.

Es importante señalar que aunque es claro que la presencia de señales como AR, *Hoxb8*, *dHand* y *Gli3* permiten inducir la expresión de *Shh*, así como su posicionamiento en la región posterior, también *Shh* mantiene la expresión de *dHand* y de los genes homeóticos.

COORDINACIÓN DE LOS TRES CENTROS DE SEÑALIZACIÓN QUE CONTROLAN LA MORFOGÉNESIS DE LA EXTREMIDAD

Las extremidades tienen una anatomía compleja en la que la organización tridimensional del esqueleto, músculos, tendones, ligamentos y nervios están organizados de una manera precisa y admirable. La organización de estos tejidos varía entre las extremidades anteriores y posteriores, así como entre las extremidades de distintas especies. Cualquier alteración entre la organización y formación de estos tejidos lleva a alteraciones en la morfología de las extremidades. Ya hemos mencionado en un principio que las extremidades se forman a partir de un primordio de células mesenquimáticas homogéneas envueltas por un ectodermo en la que los distintos centros de señalización dirigen el crecimiento próximo-distal (AER), la polaridad dorso-ventral (ectodermo dorsal/ventral) y la polaridad anterior-posterior (ZPA). Pero ¿cómo es que las distintas señales moleculares de estos tres centros organizadores controlan las interacciones celulares que permiten la morfogénesis correcta de la extremidad?

En los apartados anteriores hemos descrito de manera independiente algunos mecanismos celulares y moleculares que controlan la formación de cada uno de los ejes. No obstante, los tres centros organizadores están completamente interrelacionados, cualquier disfunción en alguno de ellos tiene repercusiones en la anatomía completa de las extremidades, así, tenemos que el crecimiento en el eje próximo-distal está bajo la influencia de los FGF presentes en la AER, el eje dorso ventral bajo la influencia de WNT7A en el ectodermo dorsal y EN1 y BMPR1A en el ectodermo ventral y finalmente SHH en el mesodermo controla el eje antero-posterior.

Luego de la eliminación del gen *Fgf4*, que se expresa en la región posterior de la AER, afecta la expresión de *Shh* en la ZPA, además de que la aplicación exógena de FGF4 induce la expresión de *Shh*. De igual manera, en el ratón nulo para *Shh* no se observa la

expresión de *Fgf4* en la región posterior de la AER. Por otro lado, el mutante de *Wnt7a* no sólo tiene alteraciones sobre el desarrollo dorso-ventral, sino que también afecta el desarrollo antero-posterior y próximo-distal de la extremidad. Esto se debe a que WNT7A induce la expresión de *Shh* en la ZPA y a su vez SHH induce la expresión de *Fgf4*, por lo tanto, al eliminar la expresión de *Wnt7a*, no hay expresión de *Shh* y de *Fgf4*⁴³ (Figura 4).

DESARROLLO DEL ESQUELETO

La diferenciación celular es un evento clave en el desarrollo de los organismos multicelulares. El mecanismo que controla el que una población celular tome un destino celular u otro es fundamental en el desarrollo de la extremidad. Durante el desarrollo apendicular, el esqueleto se compone en un inicio por cartílago y después por hueso. La diferenciación del cartílago empieza con la agregación inicial del mesénquima precondrogénico, llamado blastema condrogénico, estas células mesenquimáticas prefigurarán a los futuros elementos esqueléticos. La formación de los elementos esqueléticos durante el desarrollo del primordio de la extremidad prosigue una secuencia que inicia en la región proximal y continúa hacia la región distal formando primero el elemento del estilópodo

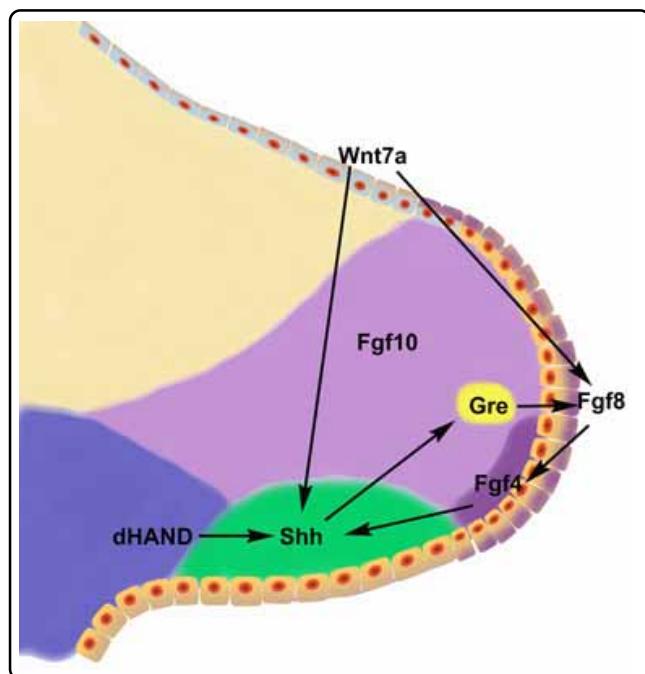


Figura 4. Interacciones moleculares entre los centros de señalamiento durante la formación de la extremidad. El FGF8 producido en la AER induce proliferación de las células del mesénquima de la Zona de Progreso. dHand induce la expresión de Sonic hedgehog (Shh) en la región posterior del primordio, la cual representa a la Zona de Actividad Polarizante (ZPA). A su vez, Shh induce a Gremlin que bloquea la acción de BMP permitiendo la expresión de FGF4 en la porción posterior del ectodermo. Además, la expresión de Shh se mantiene por FGF8. Wnt7a que se expresa en el Ectodermo Dorsal también mantiene la expresión de Shh y de FGF8.

(húmero/fémur), entonces el primordio del cartílago se bifurca para formar el zeugópodo (radio-ulna/tibia-fíbula) y finalmente se forma el autópodo (dedos)⁴⁴ (Figura 2).

Durante la formación del esqueleto, las células que se encuentran subyacentes a la AER se encuentran en un estado indiferenciado. Estas células reciben señales que promueven la diferenciación del cartílago, pero además las células interpretan las distintas coordenadas moleculares que les indican que elementos esqueléticos formarán, es decir, elementos del estilópodo, zeugópodo o autópodo con una polaridad no sólo próximo-distal, sino que además dorso-ventral y antero-posterior³⁶.

En esta sección haremos énfasis principalmente a la formación del autópodo, es decir, nos avocaremos a describir algunos mecanismos celulares y moleculares que controlan la formación de los dedos y la muerte celular en las regiones interdigitales. De manera simple, diremos que las células que formarán el autópodo reciben dos tipos de señales; el primer tipo de señal promueve la diferenciación del cartílago con la consiguiente formación de los dedos y el segundo tipo de señal promueve la muerte celular en el tejido mesodérmico que se encuentra entre los dedos. Esto último ocurre en aquellas especies que presentan dedos separados, como en el humano, el ratón o el pollo. En especies como el pato la muerte celular es inhibida, manteniendo la presencia de una membrana interdigital.

DIFERENCIACIÓN DEL CARTÍLAGO

El primer evento molecular que promueve a las células mesodérmicas a iniciar el programa de diferenciación hacia cartílago es la presencia de *Sox9*, este gen codifica para un factor de transcripción que se expresa en todas las células que iniciarán el programa de diferenciación hacia cartílago (Figura 5). La ausencia de este factor en la extremidad genera la ausencia de elementos esqueléticos y en su lugar el tejido mesodérmico muere por apoptosis^{45,46}. Una vez que se inicia la expresión de *Sox9* se inicia la cascada molecular que lleva a la expresión de los marcadores típicos del cartílago, como lo son la colágena tipo II y el Agrecano⁴⁷. Sin embargo, durante la formación de los dedos, el cartílago no se forma como una masa amorfa, sino que las células se asocian prefigurando las diferentes falanges de los dedos (Figura 5). Entre cada dedo existe un tejido que no forma cartílago, pero que sigue siendo capaz de responder (competente) a factores condrogénicos, antes de recibir las señales que promueven la muerte celular. En el embrión de pollo la aplicación de TGF β 2 (que es un factor de crecimiento que se expresa en los dedos) es capaz de inducir la formación de dedos extras⁴⁸, TGF β 2 induce la expresión de *Sox9* tan sólo 30 minutos después de la aplicación de la proteína en el interdígito. La manipulación se realiza al implantar una perla de sefarosa de aproximadamente 100 μ m en el interdígito de un embrión de pollo, bajo la observación en un microscopio estereoscópico. La cascada molecular inducida bajo estas condiciones recapitula por completo lo ocurrido de manera normal en el embrión⁴⁹. Es interesante que el

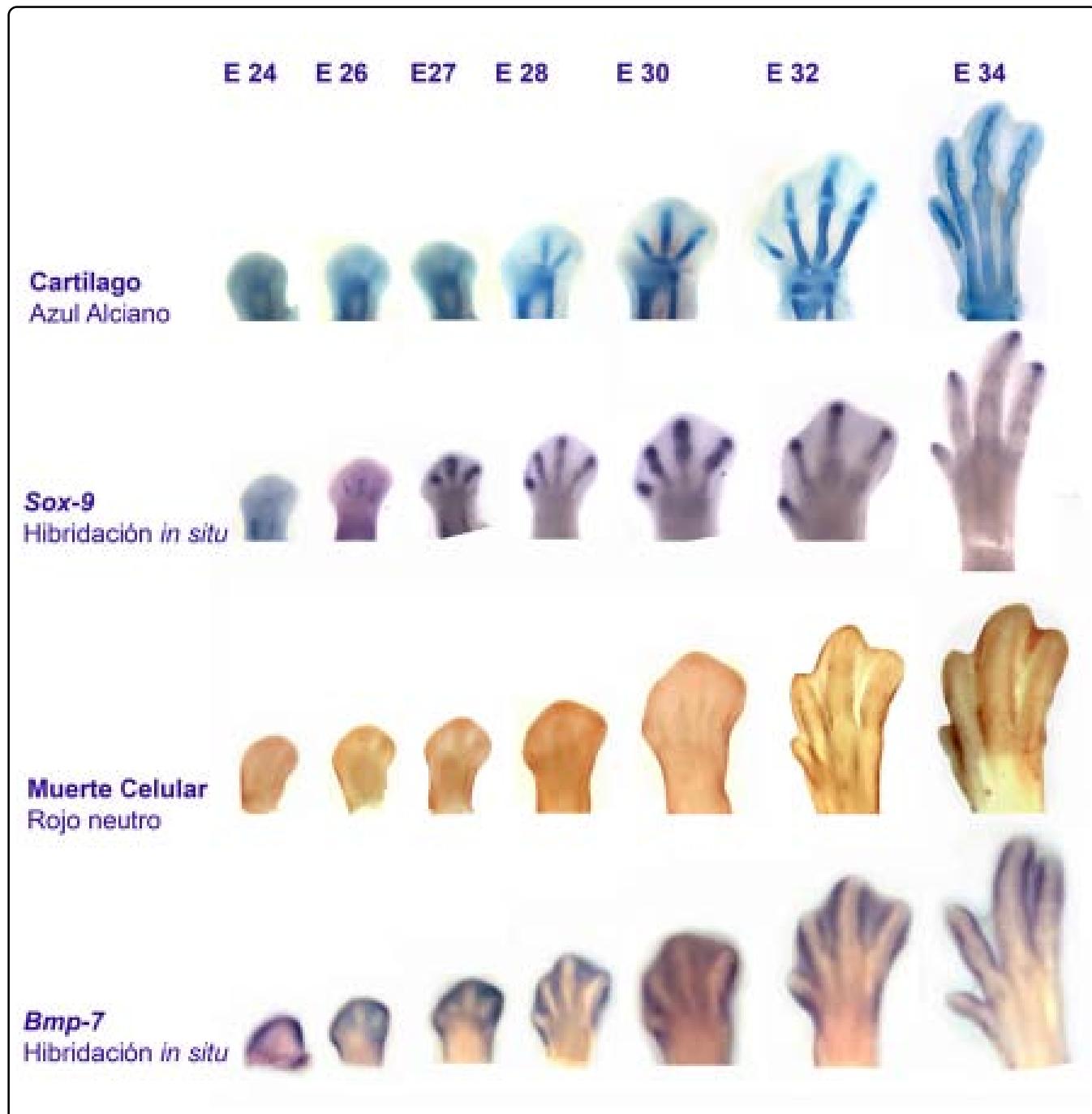


Figura 5. La formación de los elementos esqueléticos y la muerte celular contribuyen a la morfogénesis de la extremidad. En el panel superior se muestran extremidades posteriores de pollo en diferentes etapas del desarrollo teñidas con azul alciano para evidenciar el tejido cartilaginoso. Estas fotografías muestran que en un inicio, los elementos esqueléticos se constituyen de cartílago, posteriormente este tejido será reemplazado por hueso. En el segundo panel se muestra el patrón de expresión de *Sox9* durante distintas etapas del desarrollo de la extremidad. La expresión de *Sox9* precede y coincide en las zonas en donde los elementos esqueléticos se forman. Varias evidencias indican que *Sox 9* es el inductor primario de la condrogénesis. Simultáneamente a la condrogénesis, áreas específicas de la extremidad mueren por apoptosis, en el tercer panel se muestran extremidades de pollo en distintas etapas del desarrollo teñidas con rojo neutro que muestran en rojo intenso las áreas de muerte celular programada. En etapas tardías (E32 a E34) se observa a la región interdigital, que presenta una regresión por apoptosis, positiva para este colorante. En el cuarto panel se muestra el patrón de expresión de *Bmp-7* en diferentes etapas del desarrollo de la extremidad. Esta expresión se localiza en el mesénquima indiferenciado que morirá por apoptosis. Este patrón de expresión sugiere la participación de la BMP-7 en la regulación de la muerte celular interdigital y en otros procesos tal como la especificación de la identidad de los dedos.

tejido interdigital, que en condiciones normales debe morir o permanecer sin formar dedos extras, sea competente a las señales condrogénicas, sobre todo si partimos que, una señal como TGF β 2 que se expresa en los dedos en desarrollo induce la condrogénesis. Estos datos sugieren que los interdígitos además de recibir señales que promuevan su muerte probablemente deban tener señales que inhiban la condrogénesis.

MUERTE CELULAR EN EL INTERDÍGITO

Entre las señales que promueven la muerte celular en los interdígitos, están algunos miembros de la familia de las BMP, de manera particular el patrón de expresión de las *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* y *Bmp7* se observa en los interdígitos de las extremidades tanto en el embrión de pollo como en el embrión de ratón (Figura 5). La aplicación en el interdígito de perlas de sefarosa embebidas en BMP2, 4, 5 ó 7 promueve la muerte celular y al inhibir la función de estas proteínas se bloquea la muerte celular. Lo que sugiere una función endógena de estas moléculas en la muerte del interdígito^{48,50-52}. Es importante señalar que las BMP no son inductoras directas de la apoptosis, más bien participan en inducir la cascada molecular que culmina con la muerte celular por apoptosis. Entre los diferentes genes involucrados en esta cascada se encuentra *Msx1*, *Msx2*, *Dkk*, entre otros.

Aunque las BMP son moléculas importantes en la cascada molecular que promueven la apoptosis en el interdígito, no son los únicos factores que lo hacen. El AR que también participa en la inducción de la ZPA, se sintetiza en los interdígitos, además de que las enzimas que promueven su síntesis se expresan en estas zonas. Al aplicar perlas con AR en los interdígitos se induce la muerte celular. Este factor al ser inhibido en los interdígitos con antagonistas de los receptores para el AR deja de promover la muerte celular. Al aplicar AR en presencia de antagonistas de las BMP se observa una inhibición de la muerte celular inducida por AR, sugiriendo que las BMP son mediadores del AR en el proceso de muerte celular en los interdígitos. La eliminación de la señalización del AR genera la formación de sindactilias, esto es, el fenotipo generado al inhibir la muerte celular interdigital que consiste en la unión lateral de los dedos por una membrana interdigital. Si en estas condiciones se aplican perlas embebidas en diferentes BMP la muerte celular se promueve, aún en ausencia de la señalización del AR⁵³. Además de las BMP y AR hay otros factores involucrados en la muerte celular del interdígito, tal es el caso del antagonista extracelular de la señalización WNT, Dkk que al ser eliminado en el ratón genera polidactilias y sindactilias, asociando por completo a estos fenotipos al control de la muerte celular⁵⁴. De igual manera, se ha observado que distintos miembros de la matriz extracelular son importantes en el control de la muerte interdigital. Al eliminar los genes de las fibromodulinas 1 y 2 o de los nidógenos 1 y 2 ocurre la inhibición de la muerte celular del interdígito en el ratón.

En aquellas especies como el pato en que la membrana digital es permanente ocurre expresión de las BMP en la membrana

interdigital, pero como bien sabemos no hay regresión del interdígito. Esto se debe a que en esta especie ocurre la expresión en el interdígito de un antagonista de BMP llamado *Gremlin*, de manera que bloquea los efectos promotores de muerte inducidos por BMP⁵⁵.

Todos los factores mencionados previamente son factores que se ubican en el mesénquima interdigital, sin embargo, también la AER tiene un papel importante en el control de la muerte interdigital al promover la sobrevivencia celular. Ya se ha mencionado que los *Fgf8* y *Fgf4* presentes en la AER codifican para factores de supervivencia durante el desarrollo temprano de la extremidad. La expresión de *Fgf8* en la AER disminuye de manera coincidente con la aparición de la muerte celular en el interdígito. Este proceso es dependiente de BMP, de manera que al haber un aumento en la expresión de las BMP la expresión de *Fgf8* es inhibida. De igual manera, se ha observado que el bloqueo de la señalización de FGF lleva a la muerte celular⁵⁶. En la membrana interdigital de las alas de murciélago se ha observado que existe expresión de *Fgf8*. Si en embriones de esta especie se inhibe la señalización de FGF ocurre muerte celular, lo que sugiere el papel de supervivencia para FGF8⁵⁷. Por lo tanto, la expresión coordinada entre AR, BMP, Gremlin, FGF y otros factores es importante para permitir o no la regresión del tejido interdigital.

COORDINACIÓN ENTRE LAS SEÑALES PROMOTORAS DE DIFERENCIACIÓN Y SEÑALES PROMOTORAS DE MUERTE CELULAR

En la sección anterior hemos descrito algunos mecanismos celulares y moleculares que controlan la formación de los radios digitales y las membranas interdigitales en el autópodo. Pero ¿existe alguna relación entre las áreas digitales y las áreas interdigitales que sean importantes en el desarrollo de las extremidades? La respuesta es sí. Se sabe que al bloquear la señalización del AR no sólo se inhibe la muerte celular, sino que además ocurre la formación de dedos extras⁵³. Esto sugiere que el ácido retinoico puede actuar como una señal anti-condrogénica además de actuar como señal promotora de la cascada molecular que lleva a la apoptosis. Por otro lado, sabemos que el TGF β 2 promueve la condrogénesis al inducir la formación de un dedo extra en el interdígito, en estas condiciones se inhibe la muerte celular⁴⁸⁻⁴⁹. Por lo tanto, seguramente debe existir un balance de señales promotoras de apoptosis y de señales promotoras de diferenciación que deben ser coordinadas durante la formación de los dedos y las membranas interdigitales. Cualquier desbalance en estas señales llevará a alteraciones en la morfogénesis correcta de los dedos.

LA IDENTIDAD DE LOS DEDOS

Cuando observamos nuestros dedos distinguimos claramente las diferencias entre cada uno de ellos. ¿En qué momento durante el desarrollo embrionario se establecen las diferencias morfológicas que llevan a la formación de dedos con identidades

distintas? Recientemente se han empezado a dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que llevan a la identidad de los dedos. Se han distinguido dos etapas; la etapa temprana, dependiente de SHH y una segunda etapa, la tardía, dependiente de BMP y FGF.

Es conveniente recordar que SHH es considerado un morfógeno que establece el eje antero-posterior a través de la señal de la BMP-2³⁹. Adicionalmente esta función está estrechamente vinculada con la especificación de los dedos por un mecanismo en el que la señalización de las BMPs también está involucrada. El ratón nulo de *Shh* presenta distintas malformaciones en el embrión y de manera particular en las extremidades se observan alteraciones en el esqueleto. A nivel del zeugopodo se observa la formación de un solo elemento esquelético, posiblemente el elemento anterior. Sin embargo, a nivel del autópodo, se forma únicamente el dedo más anterior (dedo pulgar) y los elementos posteriores no se desarrollan. Estos datos sugirieron que SHH induce la formación de los dedos posteriores. Sin embargo, al hacer la cruja de este ratón con un ratón mutante que tiene nulo el gen *Gli3*, que se sabe es un factor de transcripción involucrado en la señalización hedgehog, se generan polidactilias, más de cinco dedos, sin identidad. Este fenotipo es muy parecido al mutante sencillo para *Gli3*. Estos resultados sugirieron que *Shh* no es necesario para la formación de los dedos pero sí lo es para establecer la identidad digital mediada por *Gli3*⁴². Ahora se sabe que SHH establece la identidad digital en el embrión de ratón de la siguiente manera; La ZPA contribuye con células que expresan *Shh* durante la formación de los dedos IV y V y se dice dependen del tiempo de expresión diferencial de SHH, el dedo III depende del tiempo de expresión y concentración, mientras el dedo II depende de bajas concentraciones del morfógeno⁵⁸. La formación e identidad del dedo pulgar es independiente de SHH. En estas condiciones SHH induce la expresión de *Tbx2*, *Bmp2*, y *Tbx3*, genes involucrados en la especificación de la identidad de los dedos.

Tbx2 y *Tbx3* codifican para factores transcripcionales que juegan papeles esenciales durante el desarrollo de varios tejidos. En la extremidad en desarrollo del pollo la sobreexpresión de las formas truncadas de estos genes resultan en la anteriorización de los dedos posteriores, es decir, los dedos posteriores adquieren identidades de dedos anteriores. Además el patrón de expresión y la sobreexpresión de *Tbx2* y de *Tbx3* en este modelo demuestran que *Tbx2* especifica al dedo IV y *Tbx3* al dedo III. Con base en experimentos de regulación se ha propuesto que durante las etapas tempranas de la especificación de los dedos, *Shh* promueve la expresión de *Tbx2* en la parte posterior del primordio que a su vez inducirá la expresión de BMP 2 y regulará negativamente tanto a la de *Gli3* como a la de *Gremlin* en la región media de la extremidad en desarrollo⁵⁹. La disminución en la expresión de *Gli3* en la región media resultará en una baja actividad de Gli3R y Gli3A en comparación a la alta actividad de Gli3A en la región posterior y Gli3R en la región anterior. La alta

actividad de Gli3 represor establece la identidad del dedo I, mientras que la actividad de Gli3A especifica los dedos posteriores, por lo tanto la baja actividad de ambas formas de Gli3 en la parte media resultará en la formación de un dedo que ni es netamente un dedo posterior ni netamente un dedo anterior, es decir un dedo II. Lo mismo sucede para *Gremlin*; cuando *Tbx2* inhibe la expresión de *Gremlin* en la parte media de la extremidad se generará un gradiente de la actividad de BMP2; la alta actividad de BMP2 en la región posterior especifica a los dedos posteriores, la actividad media especifica a los dedos medios y la baja actividad en la región anterior genera el establecimiento del dedo I. Este gradiente de actividad de BMP2 especificará la identidad de los dedos en la dirección posterior hacia la anterior.

Adicionalmente, la BMP-2 inducida por *Shh* a través de *Tbx2*, induce la expresión de *Tbx3*, que al igual que *Tbx2*, disminuirá la expresión de *Gremlin* de la parte media de la extremidad. Conviene mencionar que esta cascada no es exclusivamente direccional, sino que hay un asa de expresión positiva entre *Shh* y *Tbx2*, entre *Tbx2* y *Bmp2* y entre *Tbx3* y *Bmp2*, de tal manera que estas señales se mantienen durante la etapa temprana de la especificación de los dedos⁵⁹.

La etapa tardía de la especificación de la identidad de los dedos depende del tejido interdigital. Experimentos de aplicación de perlas de Heparina que liberan a Nogina (un antagonista de BMP) en el interdígitito, involucran nuevamente a la señal de BMP en la especificación de los dedos posteriores. Con base en estos experimentos y a la eliminación de los interdígitos se ha propuesto que el mesénquima posterior adyacente al dedo IV especifica a este dedo, el tercer interdígitito especifica al dedo III, el segundo al dedo II y el primer interdígitito al dedo I, es decir la identidad de un dedo es adquirida por señales que emanen del interdígitito posterior o subyacente a éste⁶⁰. Estas señales son las BMPs que inducen, en esta etapa de especificación de los dedos, la expresión de *Tbx2* y *Tbx3* en los interdígititos posteriores que como hemos mencionado establecerán la identidad del dedo IV y III en el embrión del pollo, respectivamente⁵⁹. Finalmente se ha propuesto que la señalización de FGF-8 en la AER es importante en la especificación de la identidad digital en la etapa tardía, ya que la aplicación de una perla embebida en el inhibidor del receptor de FGF-8 induce cambios anteriorizantes⁶¹.

CONCLUSIONES

El estudio de la extremidad en sus etapas embrionarias nos ayuda a comprender las interacciones que establecen los tejidos para alcanzar la correcta morfogénesis de una estructura y por lo tanto una función adecuada. Además, nos permite establecer los mecanismos e interacciones moleculares que gobiernan a los procesos del desarrollo, tal como la diferenciación, la proliferación celular, la apoptosis, el crecimiento, la morfogénesis y el establecimiento de patrones, necesarios para la sobrevivencia de las especies. La comparación de los procesos que llevan a la

formación de las extremidades entre diferentes especies ha llevado al desarrollo de teorías y modelos evolutivos que explican los cambios a nivel molecular que resultaron en la diversificación de las extremidades propias de cada especie. Además, los mecanismos moleculares que instauran a la extremidad pueden constituir las posibles causas generadas en las malformaciones en humanos e inclusive en la degeneración de tejidos que constituyen a la extremidad en las personas, de tal manera que se puedan proponer posibles blancos terapéuticos para abordar estos tipos de problemas.

La cada vez mayor profundización del estudio del desarrollo de la extremidad ha generado nuevas perspectivas y visiones que han cambiado las formas de ver a la embriología como una ciencia puramente descriptiva y morfológica a un área dinámica, intrigante y fascinante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a todos los miembros del laboratorio por sus valiosos comentarios a este trabajo. El presente trabajo recibió apoyo financiero por parte del CONACYT proyecto 42568Q y por parte de DGAPA, UNAM proyecto IN200205.

REFERENCIAS

- Cohn, M.J. & Tickle, C. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature* **399**, 474-479 (1999).
- Wolpert L., B.R., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. & Smith, J. Principles of Development (Oxford University Press, New York, USA, 2002).
- Mariani, F.V. & Martin, G.R. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* **423**, 319-325 (2003).
- Sanz-Ezquerro, J.J. & Tickle, C. "Fingering" the vertebrate limb. *Differentiation* **69**, 91-99 (2001).
- Gilbert, S. Development Biology (Sunderland Massachusetts, USA, 2000).
- Harrison, R.G. Experiments on the development of *Ambystoma*, a self-differentiating equipotential system. *Journal of Experimental Zoology* **25**, 413-461 (1918).
- Balinsky, B.I. Das Extremitätenseitenfeld, seine Ausdehnung und Beschaffenheit. *Roux Archives* **130**, 704-747 (1933).
- Cohn, M.J., Izpisua-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K. & Tickle, C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* **80**, 739-746 (1995).
- Stephens, T.D. & McNulty, T.R. Evidence for a metamer pattern in the development of the chick humerus. *J Embryol Exp Morphol* **61**, 191-205 (1981).
- Ng, J.K. *et al.* The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development* **129**, 5161-5170 (2002).
- Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A. & Martin, G.R. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**, 127-136 (1996).
- Kawakami, Y. *et al.* WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891-900 (2001).
- Ohuchi, H. *et al.* The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* **124**, 2235-2244 (1997).
- Sekine, K. *et al.* Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* **21**, 138-141 (1999).
- Hamburger, V. Morphogenetic and axial self-differentiation of transplanted limb primordia of two day chick embryos. *Journal of Experimental Zoology* **77**, 379-397 (1938).
- Marcil, A., Dumontier, E., Chamberland, M., Camper, S.A. & Drouin, J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development* **130**, 45-55 (2003).
- Delaunay, A., Schweitzer, R. & Logan, M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol* **299**, 22-34 (2006).
- Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Silver, L.M., Niswander, L. & Papaioannou, V.E. Involvement of T-box genes Tbx2-Tbx5 in vertebrate limb specification and development. *Development* **125**, 2499-2509 (1998).
- Rodríguez-Esteban, C. *et al.* The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* **398**, 814-818 (1999).
- Takeuchi, J.K. *et al.* Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* **398**, 810-814 (1999).
- Logan, M. & Tabin, C.J. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* **283**, 1736-1739 (1999).
- Minguillon, C., Del Buono, J. & Logan, M.P. Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell* **8**, 75-84 (2005).
- Saunders Jr, J.W. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *Journal of Experimental Zoology* **108**, 363-403 (1948).
- Mahmood, R. *et al.* A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr Biol* **5**, 797-806 (1995).
- Vogel, A. & Tickle, C. FGF-4 maintains polarizing activity of posterior limb bud cells in vivo and in vitro. *Development* **119**, 199-206 (1993).
- Lewandoski, M., Sun, X. & Martin, G.R. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-463 (2000).
- Sun, X., Mariani, F.V. & Martin, G.R. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**, 501-508 (2002).
- Summerbell, D. & Lewis, J.H. Time, place and positional value in the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* **33**, 621-643 (1975).
- Wolpert, L., Tickle, C. & Sampford, M. The effect of cell killing by x-irradiation on pattern formation in the chick limb. *J Embryol Exp Morphol* **50**, 175-193 (1979).
- Dudley, A.T., Ros, M.A. & Tabin, C.J. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-544 (2002).
- MacCabe, J.A., Errick, J. & Saunders, J.W., Jr. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol* **39**, 69-82 (1974).
- Parr, B.A. & McMahon, A.P. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*

- 374, 350-353 (1995).
33. Chen, H. & Johnson, R.L. Dorsal-ventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events. *Cell Tissue Res* **296**, 67-73 (1999).
34. Dreyer, S. D. et al. Lmx1b expression during joint and tendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets. *Gene Expr Patterns* **4**, 397-405 (2004).
35. Loomis, C.A., Kimmel, R.A., Tong, C.X., Michaud, J. & Joyner, A.L. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* **125**, 1137-1148 (1998).
36. Pizette, S. & Niswander, L. Early steps in limb patterning and chondrogenesis. *Novartis Found Symp* **232**, 23-36; discussion 36-46 (2001).
37. Saunders, J.W. & Gasseling, M.T. New insights into the problem of pattern regulation in the limb bud of the chick embryo. *Prog Clin Biol Res* **110 Pt A**, 67-76 (1983).
38. Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. & Tabin, C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-1416 (1993).
39. Drossopoulou, G. et al. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* **127**, 1337-1348 (2000).
40. Charite, J., McFadden, D.G. & Olson, E.N. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* **127**, 2461-2470 (2000).
41. Huangfu, D. & Anderson, K.V. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* **133**, 3-14 (2006).
42. Litington, Y., Dahn, R.D., Li, Y., Fallon, J.F. & Chiang, C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* **418**, 979-983 (2002).
43. te Welscher, P. et al. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* **298**, 827-830 (2002).
44. Olsen, B.R., Reginato, A.M. & Wang, W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 191-220 (2000).
45. Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. & de Crombrugghe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**, 85-89 (1999).
46. Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A. & de Crombrugghe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**, 2813-2828 (2002).
47. Lefebvre, V. & de Crombrugghe, B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* **16**, 529-540 (1998).
48. Gan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. & Hurle, J. M. Role of TGF beta s 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 (1996).
49. Chimal-Monroy, J. et al. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* **257**, 292-301 (2003).
50. Zuzarte-Luis, V. et al. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol* **272**, 39-52 (2004).
51. Merino, R. et al. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol* **200**, 35-45 (1998).
52. Merino, R. et al. Control of digit formation by activin signalling. *Development* **126**, 2161-2170 (1999).
53. Rodriguez-Leon, J. et al. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat Cell Biol* **1**, 125-126 (1999).
54. Mukhopadhyay, M. et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* **1**, 423-434 (2001).
55. Merino, R. et al. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**, 5515-5522 (1999).
56. Gan, Y., Macias, D., Basco, R.D., Merino, R. & Hurle, J.M. Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of msx gene expression in the developing autopod. *Dev Biol* **196**, 33-41 (1998).
57. Weatherbee, S.D., Behringer, R.R., Rasweiler, J.J. & Niswander, L.A. Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 15103-15107 (2006).
58. Harfe, B.D. et al. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517-528 (2004).
59. Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K. & Ogura, T. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev Cell* **6**, 43-53 (2004).
60. Dahn, R.D. & Fallon, J.F. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* **289**, 438-441 (2000).
61. Sanz-Ezquerro, J.J. & Tickle, C. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* **13**, 1830-1836 (2003).