

UCH-FC  
MAB-EBE  
S165  
C.1



**HOMEOSIS EN LA EVOLUCIÓN DEL ALA DE LAS  
AVES: UN ACERCAMIENTO COMPARATIVO Y  
EXPERIMENTAL**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en  
Ecología Y Biología Evolutiva**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Miguel Andrés H. Salinas Saavedra**

**Abril, 2012**

**Directores de Tesis:  
Dr. Jorge Mpodozis  
Dr. Alexander O. Vargas**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

**Miguel Andrés H. Salinas Saavedra**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 de Enero de 2012.

Directores de Tesis:

Dr. Jorge Mpodosis Marín

Dr. Alexander Vargas Milne

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Allende

Dr. Álvaro Glavic



*Miguel Allende*  
*Álvaro Glavic*



Tesis dedicada a Virginia Arroyo Vicentelo  
(1934-2010)



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer a mi Madre Lorena, Abuela Virgina (mami dora) y a toda mi familia por darme absoluta libertad de elegir y hacer todo lo que yo quería hacer con mi futuro académico, sin impedimentos ni presiones. En segundo lugar a mis tutores, Jorge y Alexander, por aceptarme y, a veces, aguantarme en sus laboratorios. Junto con ellos, agradecer a los integrantes del "Rayo" por la ayuda fundamental brindada durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a Solano, Elisa, Daniel, Sergio, Gonzalo Marín, João "Chico" Botelho y Cristian González quienes me prestaron el equipamiento necesario y me ayudaron a desarrollar las técnicas aplicadas. A mis amigos de la U: Pedro, Morales, Juan, Seba, Pancho, Pablo, Willy, Lucho, Chunchu, Ricardo, Rocío, Chiki, Karla, Lore, JP, Uziel, Ernesto y a toda la lista que sigue. También, agradecer a mis amigos del colegio y de toda la vida: Vicente, Fabián, Max, Eduardo, Aldo, Esteban, al vieja, al Ignacio y a todo el "team" de los cabros. Por último, no puedo dejar de agradecer a todos los pollos, conejos y ratones que involuntariamente ofrecieron sus vidas para poder realizar mis objetivos, parte de la cual no me siento orgulloso de haber hecho.

En fin, son demasiadas las personas que deberían haber estado en esta sección de mi tesis, las cuales me brindaron, indirecta o directamente, una gran ayuda, tanto en el ámbito académico como personal. Sin embargo, por razones obvias de espacio, no pude incluirlas. A todos(as) aquellos(as) que se sientan identificados(as) les digo MUCHAS GRACIAS!!





## INDICE DE CONTENIDOS

<b>BIOGRAFÍA .....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>5</b>
PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA .....	5
HOMEOSIS EN EL DESARROLLO .....	8
HOMEOSIS EN EL ALA DEL POLLO: LA APROXIMACIÓN COMPARATIVA.....	9
HOMEOSIS EN EL ALA DEL POLLO: LA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL.....	15
HIPÓTESIS DEL TRABAJO .....	20
<i>Hipótesis general</i> .....	20
<i>Hipótesis específicas</i> .....	20
OBJETIVOS .....	21
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>22</b>
TRATAMIENTO CON CICLOPAMINA .....	22



ADMINISTRACIÓN DE DII Y DIO, Y MÉTODO PARA REALIZAR EL MAPEO DE DESTINO CELULAR DEL ALA.	22
CLONAMIENTO GÉNICO, FIJACIÓN DE EMBRIONES E HIBRIDACIÓN IN SITU.....	24
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
EXPRESIÓN GENÉTICA DE LOS GENES HOXD10 Y HOXD12 EN EL CONEJO, UN AMNIOTO QUE HA PERDIDO EL DEDO 1. ....	27
EXPRESIÓN GENÉTICA DE LOS GENES HOXD10 Y HOXD11 EN ALAS DE EMBRIONES TRATADAS CON CICLOPAMINA.....	30
MAPEO DE DESTINO CELULAR.....	32
<b>DISCUSION .....</b>	<b>37</b>
MESÉNQUIMA INTERDIGITAL E IDENTIDAD DIGITAL .....	37
GRADIENTE DE SONIC HEDGEHOG, CICLOPAMINA E IDENTIDAD DIGITAL .....	39
EVOLUCIÓN DE LA MORFOLOGÍA DIGITAL HACIA EL LINAJE DE LAS AVES Y LA HIPÓTESIS DEL FRAME-SHIFT HOMEÓTICO.....	48
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS



**Tabla 1.** Sondas utilizadas en el pollo, conejo y ratón.

*Página 26*

**Tabla 2.** Número de veces que se obtuvo el mismo resultado para cada uno de los sitios de inyección (diagramados en la Figura 9) para embriones controles y tratados con Ciclopamina (+Cyc). n/a: no aplicado. *Página 33*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Hipótesis del "frame-shift" homeótico. *Página 8*

**Figura 2.** Evolución digital hacia el linaje de las aves.  
*Página 10*

**Figura 3.** Hipótesis sostenida por Woltering y Duboule.  
*Página 12*

**Figura 4.** Extremidades de embriones de pollo tratados con Ciclopamina (Cyc) a distintos días de desarrollo. *Página 15*

**Figura 5.** Reproducción experimental de un frame-shift homeótico inducido por Ciclopamina (Cyc). *Página 17*

**Figura 6.** Morfología adulta de la pata de ratón y de conejo.  
*Página 27*

**Figura 7.** Expresión de *Hoxd10* y *Hoxd12* en el conejo y el ratón. *Página 29*

**Figura 8.** Expresión de *Hoxd10* y *Hoxd11* en alas de embriones de pollo, de 7 días de desarrollo, controles y tratados con Ciclopamina. *Página 31*

**Figura 9.** Dibujo esquemático en donde se representa los sitios de inyección junto con los resultados obtenidos del mapeo de destino celular en alas de embriones controles y tratados con Ciclopamina. *Página 33*

**Figura 10.** Mapeo de destino Celular del ala en embriones controles y tratados con Ciclopamina (Cyc). *Página 34*

**Figura 11.** Expresión de los genes *Hoxd10-12* en los dígitos reportados en embriones de pollo, cocodrilo, conejo, y ratón. *Página 38*

**Figura 12.** Modelo propuesto por Vargas y Wagner (2009) para un evento de frame-shift homeótico inducido por Ciclopamina. *Página 43*

## LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

Dígitos del adulto (Números romanos)

Dígitos del embrión (Números arábigos)

BDR: Bilateral Digit Reduction

LDR: Lateral Digit Reduction

"Frame-shift" homeótico: Corrimiento homeótico del marco de identidad.

*Ubx: Ultrabitorax*

MAD: Dígito más anterior (Most Anterior Digit)

Cyc: Ciclopamina (11-deoxojervina)

*Smo: Smoothened*

*Shh: Sonic hedgehog*

*Ptc1: Patched1*

ZAP: Zona de Actividad Polarizante

GFP: Green Fluorescent Protein



## RESUMEN

La identidad de los tres dígitos del ala de las aves ha sido un tema de gran discusión entre biólogos del desarrollo y paleontólogos durante más de 140 años. Por una parte, basándose en el patrón de desarrollo de los dígitos, se sostiene que los dedos del ala de las aves son de identidad II, III y IV. En cambio, la comparación de la morfología digital en el linaje hacia las aves, sugiere que sus identidades son I, II y III. Una hipótesis propuesta para explicar dicha situación, es la ocurrencia de un corrimiento homeótico del marco de identidad ("frame-shift" homeótico) en el linaje que da lugar a las aves, donde los dígitos I, II y III del ala pasaron a desarrollarse a partir de las posiciones embriológicas 2, 3, y 4. Un "frame-shift" similar a este, ha sido propuesto para ser reproducido experimentalmente mediante la aplicación de Ciclopamina en embriones de pollo, obteniendo alas didáctilas con morfología digital 1, y 2. A pesar de esto, algunos autores han cuestionado la factibilidad mecanística de esta hipótesis desde un punto de vista celular y genético. En este presente trabajo, realicé un marcaje del linaje de las células precursoras de los dígitos en embriones de pollo tratados con Ciclopamina, mostrando que

los dedos 1 y 2 se desarrollan a partir de células que normalmente darían origen a los dedos 2 y 3 en embriones controles. Además, por medio de hibridación *in situ* del ala de embriones de pollo tratados con Ciclopamina para los genes *Hoxd10* y *Hoxd11*, se constató que tanto el patrón de expresión de los genes *Hoxd* como la identidad digital, se desplazan una posición hacia posterior al inducir experimentalmente un "frame-shift". Además, en este trabajo caractericé la expresión genética de *Hoxd10* y *Hoxd12* en embriones de conejo, cuya pata no posee el dedo 1, mostrando que dichos genes se expresan en todos los dígitos. Esto dista de lo observado en el ala de las aves, en donde la expresión se encuentra ausente en el dígito más anterior. Situación que invalida el argumento sobre cuando se pierde el dígito I, el dígito II cesaría la expresión de los genes *Hoxd*, adquiriendo las características del dedo I. En conclusión, de acuerdo a mis resultados, un "frame-shift" homeótico es consistente con la expresión de los genes *Hox* y mecanísticamente posible como una explicación al problema de la identidad digital en el ala de las aves.

## ABSTRACT

Identity of the three digits of the birds' wing has been discussed for more than 140 years by developmental biologists and paleontologists. Based on the pattern of digits formation, developmental biologists held that the wing's digits are II, III, and IV. On the other hand, comparative morphology of the digits in birds' lineage, suggests that their identities are I, II, and III. A hypothesis to explain this is that a homeotic frame-shift might have occurred in the evolution of the birds' wing, such that digits I, II, and III began developing from embryological positions 2, 3 and 4. A similar frame-shift has been proposed to be produced experimentally by administration of Cyclopamine to chicken embryos, obtaining bidactyl wings with digit morphologies 1 and 2. However, some authors have doubted if the frame-shift hypothesis is mechanistically possible in a cellular and genetic context during wing development. In the present work, I made fate-maps to follow digits formation in the development of Cyclopamine-treated wings of chicken embryos. I show that digits 1 and 2 develop from cells that in control embryos would have developed into digits 2 and 3. Moreover, by *in situ* hybridization of Cyclopamine-treated wings of chicken

embryos for *Hoxd10* y *Hoxd11* genes, it was verified that both, *Hoxd* expression pattern and digit identity, were shifted one embryological position toward posterior when a homeotic frame-shift has been induced experimentally. Furthermore, in this work I characterized the genetic expression of *Hoxd10* and *Hoxd12* in rabbit embryos, which has no digit I, showing that they are expressed in all digits. This is not like the bird wing, where expression is absent in the most anterior digit. This invalidates the argument that upon loss of digit I, digit II would cease to express these genes, resembling digit I. In conclusion, according to my results, a homeotic frame-shift is consistent with *Hoxd* expression and mechanistically possible as an explanation to the problem of digital identity in the wing of the birds.

## INTRODUCCION

### *Presentación del problema*

La identidad de los dígitos del ala de las aves ha sido un tema de gran discusión durante más de 140 años. Por una parte, suele utilizarse un criterio para identificar a los dedos en base a las posiciones relativas de los elementos esqueléticos embrionarios. En tetrápodos pentadáctilos, el precursor cartilaginoso del dedo 4 es el primero en aparecer, y se desarrolla espacialmente alineado con los cartílagos de la Ulna y el Ulnare, conocido como el "eje primario" del desarrollo de la extremidad. En aves, el dedo más posterior se desarrolla a partir del dedo del "eje primario", sugiriendo que éste es un dígito IV, y, por inferencia, que los dedos del ala de las aves son II, III, y IV. Esto ha llevado a una vieja explicación, popular en la biología del desarrollo, en donde se sostiene que las aves descienden de algún ancestro que ha perdido los dígitos I y V. Hipótesis conocida como reducción bilateral de los dígitos (BDR: Bilateral Digit Reduction).

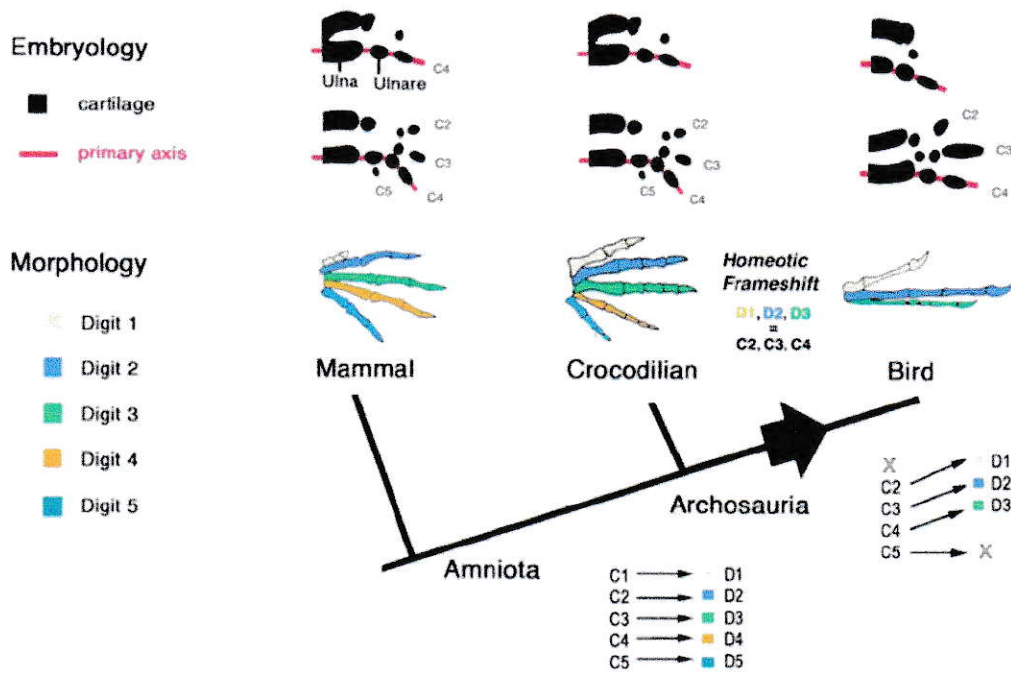


Sin embargo, la morfología de los dígitos de aves tempranas, como *Archaeopteryx*, corresponden a la de los dígitos I, II, y III de reptiles pentadáctilos. Es por esto que se sostiene que los dígitos del ala de las aves corresponden a los dígitos I, II, y III en vez de II, III, y IV, lo cual implicaría que del eje primario de las aves se desarrollaría el dígito 3 y no el dígito 4. Esta hipótesis se conoce como reducción lateral de los dígitos (LDR: Lateral Digit Reduction), la cual sostiene que las aves descienden de terópodos dinosaurios que han perdido los dígitos IV y V

Una hipótesis propuesta a favor del LDR, es que ha ocurrido un corrimiento homeótico del marco de identidad ("frame-shift" homeótico) en el linaje que da lugar a las aves, donde los dígitos I, II, y III del ala pasaron a desarrollarse a partir de las posiciones embriológicas de los dígitos 2, 3, y 4 (Figura 1). Experimentalmente, existe evidencia de que es posible reproducir un desplazamiento de marco semejante al hipotético evento evolutivo, lo cual apoya su factibilidad mecanística (Vargas y Wagner 2009). Adicionalmente, la comparación de la expresión genética con otros amniotos apoya la noción de que el dedo más anterior



de las aves es un dedo I, pese a desarrollarse en la posición embriológica del dedo 2. Sin embargo, tanto en el acercamiento experimental como en el comparado, existen importantes observaciones pendientes, que pueden o no conformarse a algunas expectativas de la hipótesis del corrimiento de marco homeótico.



**Figura 1.** Hipótesis del "frame-shift" homeótico. En las aves, los dígitos (D) 1, 2, y 3 se desarrollan a partir de una condensación (C) cartilaginosa que en amniotos pentadáctilos originarían a los dígitos 2, 3, y 4. Hipótesis formulada a partir de datos provenientes de la comparación embriológica (Embryology) y morfológica (Morphology). Imagen tomada de Vargas y col. 2008

### ***Homeosis en el desarrollo***

Al evaluar el desarrollo de cualquier estructura biológica se pueden distinguir tres grandes niveles: posición embriológica de origen, morfología del adulto, y expresión genética. Es bien conocido por los biólogos del desarrollo que estos niveles no son jerárquicos y pueden estar desacoplados; por ejemplo, la morfología y la expresión genética típica de una estructura pueden desarrollarse, en conjunto, en una posición embriológica distinta como el resultado de una mutación o manipulación experimental. Un famoso ejemplo de esta situación es el de la mosca mutante *bitorax*, en la que el tercer segmento desarrolla la identidad del segundo, sin expresar *Ubx* y desarrollando un par de alas.

Escenarios como este, en donde una estructura adquiere las características propias de otra estructura serialmente homóloga, se conocen como homeosis, situación de la cual una estructura se desarrolla a partir de una parte del embrión con un contexto morfo-genético distinto del que se desarrollaría normalmente.

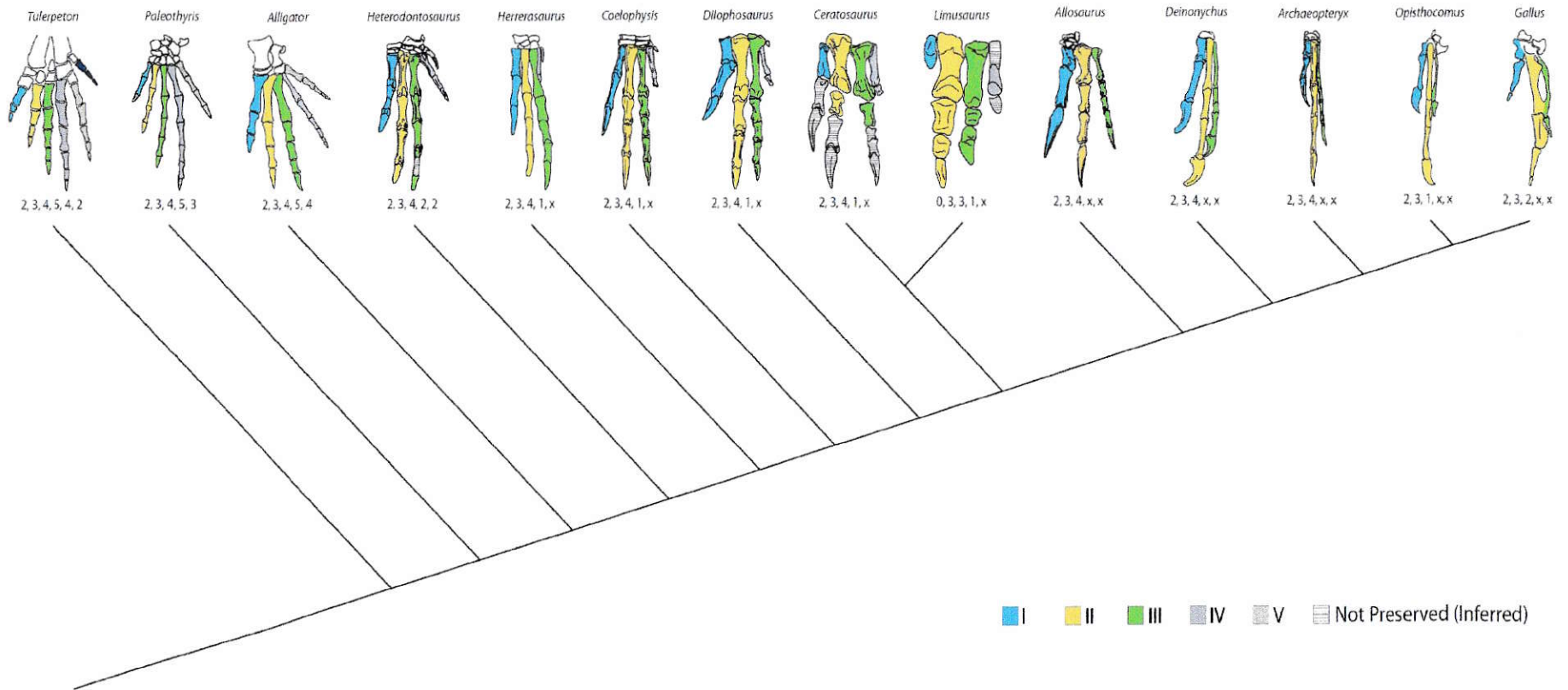
Como se mencionó anteriormente, en las aves, los dígitos del ala se desarrollan a partir de las posiciones

embriológicas correspondientes a los dedos 2, 3, y 4 de reptiles pentadáctilos. Sin embargo, la morfología de los dígitos de aves tempranas (*Archaeopteryx*) y actuales (pollo *Gallus gallus*), corresponden a la de los dígitos I, II, y III (Figuras 1 y 2). De acuerdo a esto se ha sugerido que, en el linaje que da origen a las aves, ha ocurrido una homeosis en el desarrollo del ala. Hipótesis conocida como "frame-shift" homeótico (Figura 1), ampliamente estudiada en el pollo.

### ***Homeosis en el ala del pollo: La aproximación comparativa***

A lo largo del registro fósil existe una gran cantidad de evidencias morfológicas que sustentan la hipótesis BDR.

Los primeros tres dígitos de lagartos, cocodrilos y dinosaurios poseen 2, 3, y 4 falanges, una condición plesiomórfica heredada de un remoto ancestro común y claramente esta presente en la mano de amniotos tempranos del Carbonífero como *Paleothyris* (Figura 2; Vargas y Fallon 2005b).



**Figura 2.** Evolución digital hacia el linaje de las aves. La fórmula falangeal se observa altamente conservada en la evolución hacia las aves, especialmente para los dígitos I y II. Estos dígitos poseen 2 y 3 falanges, respectivamente, fórmula presente desde *Tulerpeton*. Imagen cortesía de Sergio Soto Acuña.

Aves tempranas, como *Archaeopteryx* y *Confuciusornis*, poseen una mano con tres dígitos, los cuales presentan la fórmula falangeal (2-3-4) diagnóstica para los dígitos I, II, y III (Wagner y Gauthier 1999, Vargas y Fallon 2005b). Esta fórmula está presente desde *Tulerpeton* (Figura 2), por lo tanto es una sinapomorfía que emerge en el Devónico tardío, antes del origen de los tetrápodos. Esta fórmula falangeal ancestral persiste en las aves basales, al menos para los dígitos I y II, como se observa en el paleognata *Struthio* y neognata *Opisthocomus* (Figura 2).

Los mecanismos genético-moleculares que especifican la morfología de los dedos recientemente han sido objeto de considerable interés (Harfe y col. 2004, Suzuki y col. 2004, Zákány y col. 2004, Cobb y Duboule 2005, Tickle 2006, Butterfield y col. 2010). La comparación de la expresión de genes entre amniotas revela que el dígito 1, con dos falanges, presenta una expresión conservada de genes *Hoxd* tardíos. Los genes *Hoxd13* y *Hoxa13* se expresan en todos los dedos, sin embargo, la expresión de los genes *Hoxd10*, *Hoxd11* y *Hoxd12* se encuentra ausente solamente en el dedo 1, expresándose en el resto de los dígitos (Vargas y Fallon 2005b, Vargas y col. 2008). Además, la morfología



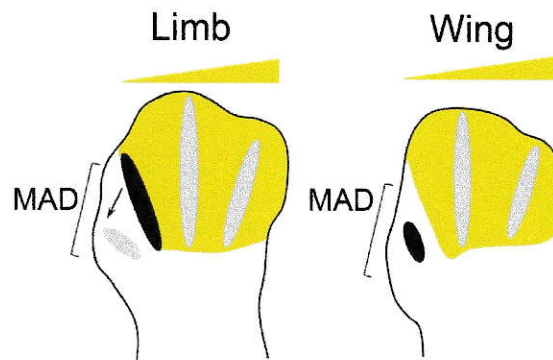
bifalangeal del dedo I ha sido conservada desde el ancestro común más reciente de todos los amniotos vivientes, hace aproximadamente 300 millones de años (Vargas y Fallon 2005b). En el ala de las aves, el dedo más anterior es bifalangeal y no expresa *Hoxd10-12* (Nelson y col. 1996, Vargas y Fallon 2005b, Vargas y Wagner 2009, Woltering y Duboule 2010), sugiriendo que este es un dedo 1 que ha pasado a desarrollarse a partir de la condensación embriológica de un dedo 2.

Por otra parte, recientemente, se ha propuesto que el dinosaurio Ceratosaurio *Limusaurus*, que presenta BDR, puede representar una etapa intermedia en el linaje de las aves, en la cual habría ocurrido gradualmente una reducción y pérdida digital (Xu y col. 2009). Posterior a esta etapa, los dedos II, III y IV habrían adquirido convergentemente una morfología semejante a la de un dinosaurio que presente LDR. Sin embargo, para estos autores, aun conservarían su identidad original, proponiendo un escenario contrario al propuesto por la hipótesis del "frame-shift" homeótico.

Según Woltering y Duboule (Woltering y Duboule 2010), la pérdida del dígito más anterior (MAD) de cualquier



extremidad de un amnioto implicaría que el nuevo MAD, el dedo 2 (trifalangeal) en el caso de *Limusaurus* y de las aves, adquiriría el perfil de expresión propio del dedo 1, cesando la expresión de los genes *Hoxd* (Figura 3). Por lo tanto, estos autores consideran que la ausencia de la expresión de los genes *Hoxd* en el dígito más anterior no indicaría que este sea un dedo 1.



**Figura 3.** Hipótesis sostenida por Woltering y Duboule, en donde la pérdida del dedo más anterior (MAD) de la extremidad (limb) gatillaría los cambios morfo-moleculares observados en el ala de las aves (wing). Una vez ocurrida esta pérdida digital, el dígito 2 pasa a ser el MAD, adquiriendo todas las características de un dedo 1, el cual siempre recibirá la menor dosis de los genes *Hox*. Imagen tomada de Woltering y Duboule 2010.

Actualmente, se desconoce lo que sucede con la expresión de los genes *Hoxd* en un amnioto que, como *Limusaurus*, haya perdido el dedo I a la vez que conserva la morfología de

los dedos II y III. Es posible que en estos casos, el dedo 2 (trifalangeal) adquiriera el perfil de expresión propio del dedo 1, sin cambio morfológico. De ser así, sería posible cuestionar la necesidad de la homeosis para explicar la expresión genética del ala de las aves. Sin embargo, si el dedo 2 mantiene la expresión de estos genes, la alta conservación de la relación entre morfología y perfil de expresión fortalecería la inferencia de homeosis (cambio simultáneo de expresión genética y morfología).

Desde un punto de vista experimental, es posible observar que en muchos mutantes de las extremidades del ratón y el pollo se mantiene la relación entre expresión de los genes *Hox* y la morfología (Vargas y Fallon 2005a, Vargas y Fallon 2005b). Por lo que, para dilucidar esto, es crucial la observación del patrón de expresión de los genes *Hox* en la extremidad de un amnioto que ha perdido el dedo I naturalmente. Interesantemente, actualmente existen mamíferos que han perdido el dígito mas anterior en alguna de sus extremidades, conservando la morfología de los dígitos II al V. Un ejemplo de esta situación es el conejo, donde sus extremidades posteriores no poseen el dedo I. Mediante la caracterización del patrón de expresión de los genes *Hoxd* en las pata del conejo, será posible evaluar si

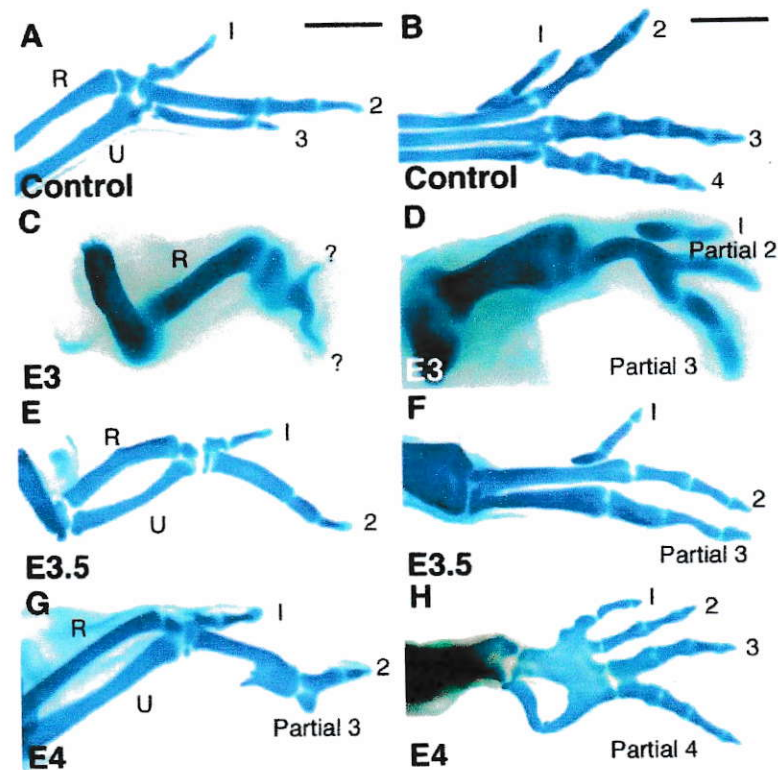
la pérdida del dígito mas anterior gatilla un cambio en este patrón, en comparación con otros amniotes, sin producir un cambio en la morfología de los dígitos restantes.

### ***Homeosis en el ala del pollo: La aproximación experimental***

La hipótesis del "frame-shift" homeótico implica que tanto la morfología como la expresión genética se desplazaron una posición embriológica hacia posterior, a la vez que se perdió el dedo más posterior (dedo IV), dejando solo estructuras de morfologías digitales I, II y III (LDR).

Experimentalmente Scherz (Scherz y col. 2007) mostró que al aplicar Ciclopamina a embriones de pollo de tres días y medio de desarrollo, en donde ocurre la especificación digital, se obtienen embriones que presentan alas didáctilas con pérdida del dígito mas posterior (Figura 4E). La Ciclopamina es un alcaloide orgánico que se une directamente a *Smoothed* (*Smo*), bloqueando la acción de este co-receptor presente en la vía de *Sonic hedgehog* (*Shh*) (Chen y col. 2002). Vía de señalización importante en los

procesos de especificación y crecimiento del ala de las aves y amniotes (Butterfield y col. 2010).



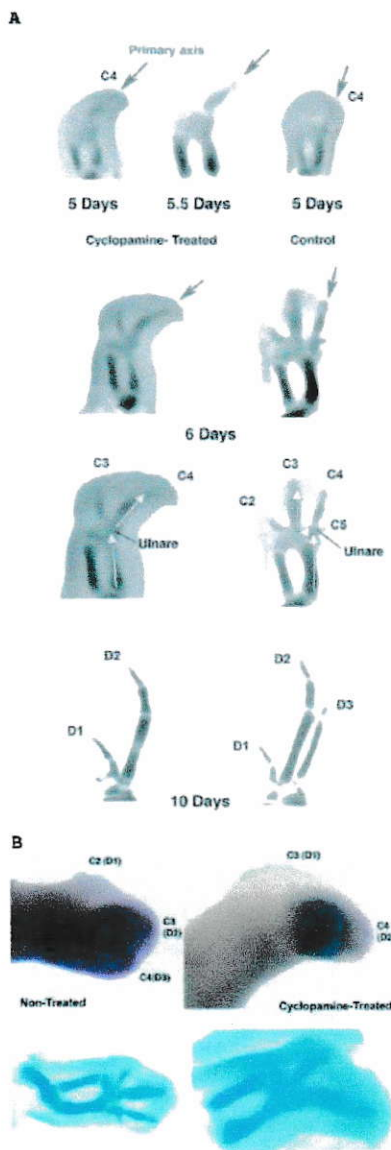
**Figura 4.** Extremidades de embriones de pollo tratados con Ciclopamina (Cyc) a distintos días de desarrollo hasta el momento de su análisis. A, C, E, y G, corresponden a alas de pollo. B, D, F, y H, corresponden a patas de pollo. A y B, ala y pata control. Al administrar Cyc al embrión de pollo a los tres días de desarrollo (E3), se obtiene una ala que presenta pérdida de la Ulna con una reducción del autópodo a dos estructuras digitales inidentificables (C) y una pata que presenta la ausencia de la fíbula y del dígito 4 (D). Al administrar Cyc a un embrión de tres días y medio (E3.5), se observa un ala didáctila debido a la pérdida del dedo 3 (D), además, se observa una pérdida del dedo 4 y una reducción a tres falanges en el dedo 3 de la pata (F). Al aplicar la Cyc en el día 4 de desarrollo (E4), se obtienen morfologías con elementos fusionados (G, H). Barra de escala: 1mm. R: Radio, U: Ulna. Modificado de Scherz y col. 2007.



Basándose en estos experimentos, Vargas y Wagner (Vargas y Wagner 2009) describieron un caso experimental de un "frame-shift" homeótico de morfología y expresión genética con estas características. En este estudio, ellos observaron el patrón de formación de cartílago y la expresión genética del gen *Hoxd12* en embriones de pollo controles y tratados con Ciclopamina en el día 3 de desarrollo (Figura 5). La identificación de la posición embriológica de los dígitos en estos experimentos se hizo observando el eje primario, el cual da origen a un dedo con la morfología correspondiente al dedo medio (Figura 5A). De acuerdo a esto, los restantes dedos anteriores y medio se desarrollarían a partir de las posiciones embrionarias que normalmente darían lugar a los dedos medio y posterior. La expresión del gen *Hoxd12* también se ve desplazada (Figura 5B), sugiriendo que estamos ante un "frame-shift" homeótico.

Estos experimentos comprueban la factibilidad mecánica de la inferencia del corrimiento homeótico, y sugiere la participación de la vía de señalización de *Shh*. Sin embargo, estas observaciones fueron realizadas a nivel morfológico mediante la tinción de cartílago sin entregar una prueba celular, a pesar de que mediante esta técnica es posible observar el patrón de divisiones celulares y su posible

descendencia. Por lo tanto, mediante un marcaje de células y el mapeo de sus destinos en el desarrollo digital, se podría obtener una línea independiente de comprobación a esta hipótesis.



**Figura 5.** Reproducción experimental de un frame-shift homeótico inducido por Ciclopamina (Cyc). A, Comparación del patrón de formación de cartílago entre embriones tratados con Cyc y embriones controles. Al aplicar Cyc se produce un corrimiento hacia posterior, en donde el dígito 2 (D2) se desarrolla a partir de la condensación 4 (C4) alineada con el eje primario, la cual normalmente desarrolla un dedo 3 (D3). B, Comparación de la expresión de *Hoxd12* en alas de embriones de pollos tratados con Cyc y embriones controles. Al aplicar Cyc, al igual que la morfología, se produce un corrimiento hacia posterior de la expresión de *Hoxd12*. En ambos casos, la expresión se encuentra ausente en el dígito 1 (D1). Las tinciones de cartílago se muestran como referencia. C(1, 2, 3, 4, y 5): condensación cartilaginosa (1, 2, 3, 4, y 5), D(1, 2, y 3): dígito (1, 2, y 3). Imagen tomada de Vargas y Wagner 2009.



Si bien existen tres estudios preliminares de mapas de destino celular en alas de embriones de pollos (Towers y col. 2008, Tamura y col. 2011, Towers y col. 2011), estos no entregan información concluyente para rechazar o confirmar la ocurrencia de un "frame-shift" homeótico. Dos de estos estudios se realizó en alas tratadas con Ciclopamina (Towers y col. 2008, Towers y col. 2011). En el primero (Towers y col. 2008), no existe claridad de los estadios en los cuales realizaron la inyección del marcador. Además, observaron el destino final en un estadio temprano, en el que no se distinguen los precursores de los dígitos. En cambio, en el segundo no se observó el destino celular de ningún dígito (Towers y col. 2011). El tercer estudio fue realizado en embriones de pollo sin aplicar Ciclopamina (Tamura y col. 2011) con conclusiones asertivas en el tema. No obstante, para efecto de la especificación digital, se utilizaron estadios tardíos en los cuales la especificación ya ocurrió. Un mapeo específicamente orientado a esta hipótesis determinaría si efectivamente el efecto de la Ciclopamina corresponde a un "frame-shift" homeótico, tal que células precursoras de los dedos medio y posterior dan origen a los dedos anterior y medio.

En resumen, este presente trabajo pretende dilucidar si la ocurrencia de un "frame-shift" homeótico, durante la evolución hacia las aves, es mecanísticamente posible durante el desarrollo al inducir experimentalmente este cambio homeótico. De esto, se espera que el cambio morfológico observado sea simultáneo con el cambio genético inducido, condición necesaria para afirmar que los dígitos de las aves actuales correspondan a los dígitos I, II, III, y no II, III, IV.

### ***Hipótesis del trabajo***

#### **Hipótesis general**

En la evolución del ala de las aves hubo un evento de corrimiento homeótico, tal que ambos, morfología y expresión de los genes *Hoxd10*, *Hoxd11* y *Hoxd12*, se desplazaron una posición digital hacia posterior.

#### **Hipótesis específicas**

1. En un amnioto, como el conejo, en que se ha perdido el dedo 1 sin homeosis, la expresión genética de los

genes *Hoxd10-12* no se verá desplazada una posición digital hacia posterior, sino que estará presente en los dedos 2-5. Por lo tanto, la expresión de estos genes en la pata del conejo es distinta a la observada en el ala de las aves y contraria a lo supuesto por Duboule.

2. La aplicación de Ciclopamina en un amnioto (como el pollo) que presenta homeosis, produce un corrimiento homeótico en una posición hacia posterior, tanto de la morfología como la expresión genética, tal que los dedos anterior y medio se desarrollan a partir de células que normalmente darían origen a los dedos medio y posterior.

### **Objetivos**

1. Evaluar la correspondencia entre expresión de los genes *Hoxd10-12*, morfología, y posición embriológica en la aparición evolutiva y experimental
  - a. Caracterizar la expresión de genes *Hox* en los dígitos de una especie (el Conejo) que ha perdido el dedo 1 (respondiendo a Hipótesis específica 1).

b. Caracterizar la expresión de genes *Hoxd10* y *Hoxd11* en los dígitos del ala del pollo tratada con Ciclopamina en el estadio E3.5, y compararlas con alas controles (respondiendo a Hipótesis específica 2).

2. Caracterizar las células precursoras que contribuyen a la formación de los dígitos en el ala de embriones tratados con Ciclopamina durante el estadio E3.5.

a. Realizar un mapeo de destino celular del desarrollo del ala de embriones tratados con Ciclopamina durante el estadio E3.5, y compararlo con alas de embriones normales (respondiendo a Hipótesis específica 2).

## **MATERIALES Y METODOS**

### ***Tratamiento con Ciclopamina***

Se utilizó el procedimiento previamente descrito en Vargas y Wagner (2009). En resumen, se realizó una pequeña ventana (apertura) en el huevo al día 3-3.5 de desarrollo embrionario, de tal modo de obtener embriones en las etapas HH18-22 (descritas por Hamburger y Hamilton 1992). Estadios utilizados al momento de aplicar Ciclopamina. Se administró dentro de la cavidad amniótica, en contacto directo con el embrión, 5  $\mu$ l de una solución de 1 mg/ml de Ciclopamina (LC Laboratories) en 45% 2-hidropropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBC; Sigma). Para los embriones, en los cuales se realizaron los experimentos de destino celular, la Ciclopamina se administró después de realizar el marcaje celular.

### ***Administración de DiI y DiO, y método para realizar el mapeo de destino celular del ala.***

Los huevos de pollos Broiler fueron incubados a 38°C y los estadios de desarrollo fueron seleccionadas de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1992). Las células de la extremidad prospectiva derecha fueron marcadas con DiI (1,1-dioctadecy



1-3,3,3',3'-tetramethyl indocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) y DiO (3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine, perchlorate; Molecular Probes), tintes lipofílicos fluorescentes que marcan la membrana celular y no difunden hacia células vecinas. Ambos tintes fueron preparados de acuerdo a Li y Muneoka (1999), y el marcaje celular se realizó según los protocolos descritos por Sato y col. (2007) y Vargesson y col. (1997). DiI (1% en 100% Etanol) y DiO (1% en dimetilformamida) fueron administradas por inyección a presión usando un Picospritzer®III (Parker Hannifin Corporation; General Valve), mediante una micropipeta con la punta abierta hecha a partir del estiramiento un capilar de borosilicato de un diámetros interno de 0,78mm. Para poder inyectar en las células precursoras de los dígitos, los embriones fueron cosechados e inyectados *in ovo* en el estadio HH18 en la región sub-apical de acuerdo a Vargesson y col. 1997. Inmediatamente después, se fotografió el sitio de inyección y se volvió a incubar a 38°C hasta el estadio HH31, en donde se fotografiaron las alas inyectadas bajo un microscopio de fluorescencia para observar el destino de las células marcadas. Este procedimiento se realizó tanto para embriones controles como para embriones tratados con



Ciclopamina. En todos los experimentos realizados se midió la posición y tamaño de la marca realizada, de esta manera poder comparar estos parámetros entre distintos individuos al momento de la inyección y después del periodo de incubación. Para el conteo de casos experimentales, solamente se consideraron los embriones que sobrevivieron al tratamiento. El tamaño promedio inicial de la marca inyectada fue entre 60 y 100 $\mu$ m, de esta manera poder marcar los distintos ejes del ala, especialmente el eje primario (basado en Sato y col. 2007).

***Clonamiento génico, fijación de embriones e Hibridación in situ.***

El clonamiento de los genes estudiados se realizó de acuerdo a los protocolos estándares existentes para este procedimiento. Básicamente consiste en la extracción fenólica de ARN, obtención y amplificación del cADN, transformación bacteriana utilizando el vector pGEM®-T Easy, secuenciación y obtención de la sonda. Las secuencias para cada uno de los cADN utilizados se encuentran en la Tabla 1.

Los embriones de pollo, conejo, y ratón fueron colectados a los 7, 14, y 13 días de desarrollo, respectivamente. Estos

se fijaron en Paraformaldehído (PFA) al 4% durante 2 horas o durante toda la noche (over night). Luego, los embriones fueron deshidratados por medio de una serie ascendente de alcohol metílico y guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los embriones de pollo rehidratados (al momento de realizar la hibridación *in situ*) se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 6% en PBST (PBS mas 0,1% Tween) por 30 minutos. Los embriones de ratón y conejo fueron rehidratados y tratados con buffer de acetilación (trietanolamina, anhídrido acético, y ácido clorhídrico) por 10 y 40 minutos, respectivamente. Posteriormente, se trataron con una solución de proteinasa K ( $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) en PBST por 30 minutos y se volvió a fijar en una solución de PFA 4% + 0,1% Glutaraldehído por no mas de 20 minutos. Los embriones se pre-hibridaron por 3 a 6 horas a  $65^{\circ}\text{C}$  y se hibridaron durante toda la noche a  $67-70^{\circ}\text{C}$ . Estos fueron lavados dos veces con una solución 50% formamida, 5X SCC, y 1% SDS, y luego, tres veces con una solución 50% formamida, 2,5X SCC, y 0,1% Tween. Se bloqueó por 3 a 6 horas con solución de bloqueo (2% blocking reagent de Roche mas 5% HINGS en buffer MABTw). Se incubó con el anticuerpo a  $4^{\circ}\text{C}$  y se reveló con una solución de NBT/BCIP. Finalmente, se clareó con metanol para luego ser montados y fotografiados.

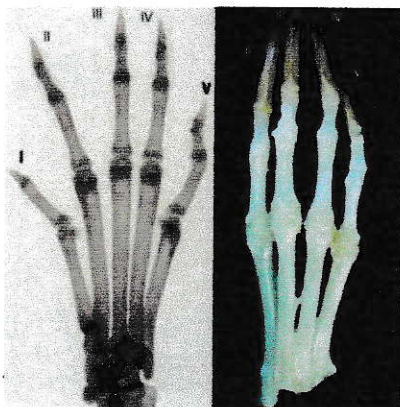
Tabla 1. Sondas utilizadas en el pollo, conejo y ratón.

Nombre Gen	Secuencia
<b><i>Gallus gallus</i> (Pollo)</b>	
<b><i>Hoxd10</i></b>	TCCCTTCCTACCAGAGGCTGGTGTCTGAATCATGCCCCATNGAGAACCCCCGAGGT TCCCGTCCCAGGATATTTTAGACTGAGCCAGACCTACGCCACTGGGAAAACCCAA GAGTACAATAATAGCCCTGAAACGAGTTCAACCATAATGTTACAGTTAAACCCTC GCGGCAGCTCCAAACCGCAGCTATCTTCTCAACTTCA
<b><i>Hoxd11</i></b>	TTGCTCTTCTCTGCAACAGCCTCACCGGGAGGGGAAGCGGCGCCGCTCGCCGTTG TCACTTTCCTTCTCCTGGCCGGAAGGTGCCTTGCTGCAGGCGCTGTGCTGGGGCTT CAGCTCGCCCTTGTCGCGTCCCCCTCGCCCTCGGAGTGTGCTGGTACGGGGGC GCGGGGGCCGCTCGTAGAACTGGTCGAAGCCCTGCGGCAGGATGCCGTTCCCTCC CCACCGAGCCGTAGAAGTTGGAGGCGGCGGGGACGCTCCGTTGGTGGCCGCACAC GGGGTCCGTTTGAATAGCATTTCCTCCTCCTGTTCCGCGGGCTGCAGAAAGTCT CTGTGCATCACCTCTTCAGCTGAGTAATAGGGAGCGTAACTGCCCTGTACTGCC ATTTGCCGCGCTCTAATCCGTATTCCTGAATGCCACT
<b><i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo) y <i>Mus musculus</i> (Ratón)</b>	
<b><i>Hoxd10</i></b>	ACAGTTGGACAGACCCGAACAGATCTTGTCGAATAGAGCAACCTGTTACACAGCA AGTCCCCACTTGCTCCTTCACCACCAACATTAAGAAGAATCCAATTGCTGCATG TATTCTGATAAGCGCAACAACTCATTCTGCCGAGGTCCCTTCGTACCAGAGGC TGGTCCCCGAGTCCCTGTCCCGTTGAGAACCCTGAGGTTCCCTGTCCCTGGATATTT TAGACTGAGTCAGACCTACGCCACCGGGAAAACCCAAGAGTACAATAACAGCCCC GAAGGCAGTCCACTGTATGCTCCAGCTCAACCCTCGTGGCGGGCCAAGCCG AGCTCTCCGCCGCCAGCTGCAGATGGAAAAGAAGATGAACGAGCCCAGCGAGCGG CCAGGAGCCCACTAAAGTCTCCCA
<b><i>Hoxd12</i></b>	CTTCGGCGGGCTTGCTCTGCAGTCCCTACCTGGCCGGCTCCGGGCCTCTGGGCCTG CAGCCCCGGGGCGCCAAGGACGGACCCGAAGAGCAGGCCAAGTTCTATTGCGCCG AAGCAGCCGCCAGTCCGGAGGAGCGCGCCGTACGAGGCCGCCCTTCGTCCAGAG GTCTAGCTTGGCCCCTGCAGCCGCTGCTCTCAAGGCCAAATACGACTACGCGGGT ATGGGCCGTGCGCGCCGGGCTGCGACCCTGCTCCAGGGGGCCCCCTGCGCCG CCGGCTTCAAGGAGGATACGAAGGGCAGCTCAACTGAACATGACAGTGCAGGC GGCAGGCGTCTCCTTGCCTGAGACCTTCGCTGCCCGACG

## RESULTADOS

### ***Expresión genética de los genes *Hoxd10* y *Hoxd12* en el conejo, un amnioto que ha perdido el dedo 1.***

La pata del conejo ha perdido el dígito I, conservando la morfología de los dígitos II al V: un metacarpo alargado en el dígito II y una formula trifalangeal en todos los dedos (Figura 6). Por lo tanto, la caracterización de estos genes en la pata del conejo es crucial para evaluar la hipótesis específica 1 sobre la correspondencia entre la expresión de los genes *Hoxd* y la identidad digital cuando se ha perdido el dígito mas anterior. Y de este modo, será posible evaluar también, la hipótesis propuesta por Woltering y Duboule (2010) para amniotos que presentan la pérdida del digito mas anterior en alguna extremidad, en este caso la pata del conejo.



**Figura 6.** Morfología adulta de la pata de ratón (izquierda) y de conejo (derecha). La pata del conejo ha perdido el dedo 1. Cortesía de Sergio Soto Acuña.



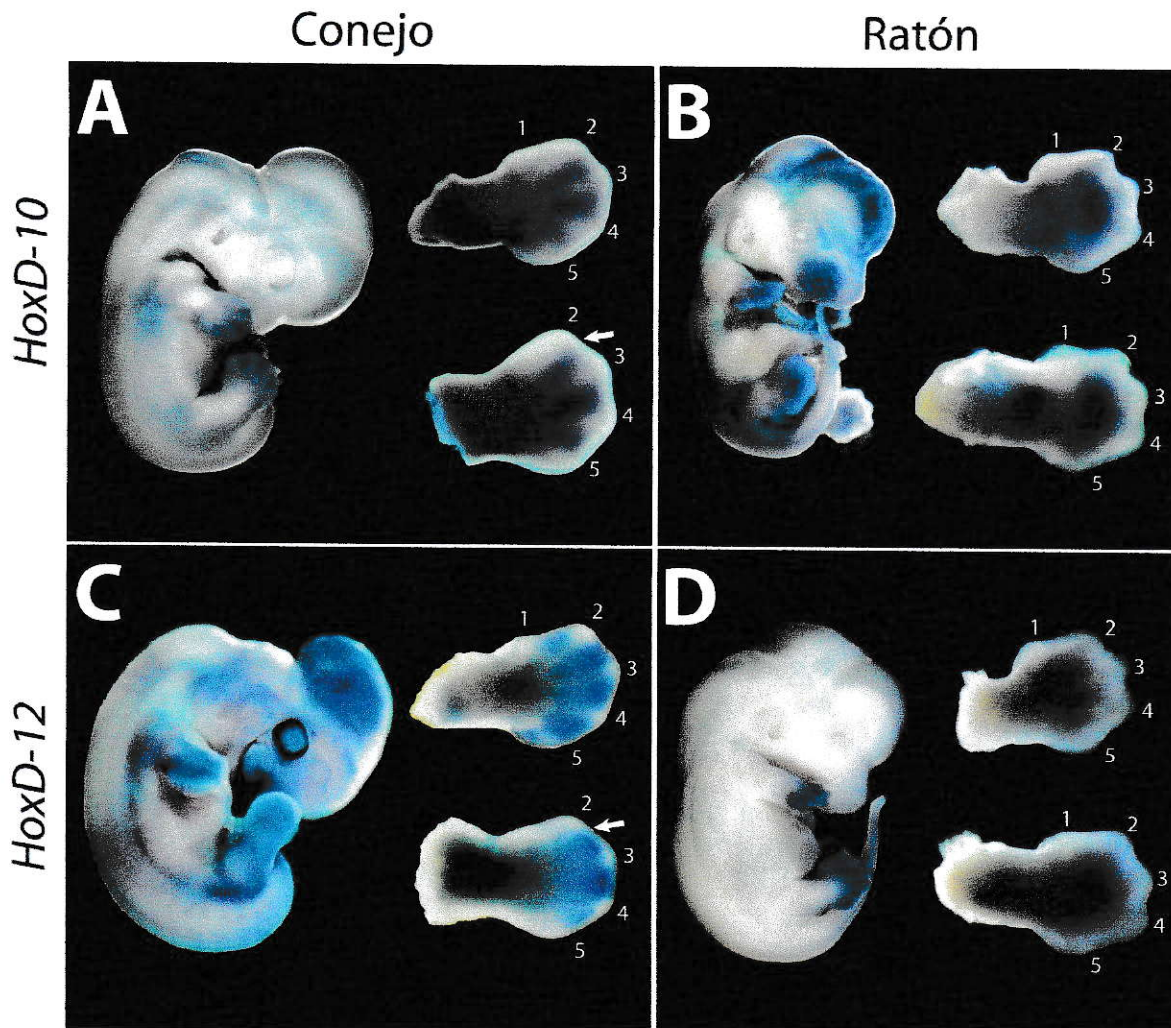
Los resultados obtenidos indican que la expresión de los genes *Hoxd10* y *Hoxd12* en ambas extremidades, anterior y posterior, en el estadio E14 es bastante similar a la expresión de estos genes en el ratón en el estadio E13 (Figura 7), estadio equivalente al E14 en el conejo.

El gen *Hoxd10*, en la mano del conejo (n=6; Figura 7A) y en ambas extremidades del ratón (n=6; Figura 7B), se expresa en la zona interdigital posterior de todos los dígitos con excepción del dígito mas anterior. En cambio, en la pata del conejo, este gen se observa expresado en la zona interdigital posterior de todos los dígitos que morfológicamente corresponden a los dedos 2, 3, 4, y 5 (n=6; Figura 7A). Un patrón similar se observa para la expresión del gen *Hoxd12*; en la mano del conejo (n=6; Figura 7C) y en ambas extremidades del ratón (n=6; Figura 7D) solo se encuentra ausente en el dígito 1, y en la pata del conejo, se expresa en todos los dígitos (n=6; Figura 7C). A diferencia del gen *Hoxd10*, *Hoxd12* se expresa en ambas zonas interdigitales, anterior y posterior.

Esto indica que, a diferencia de lo propuesto por Woltering y Duboule (2010), la pérdida digital no altera la expresión de los genes involucrados en la especificación digital, y



por ende, tampoco la identidad morfológica, conservando sus morfologías.



**Figura 7.** Expresión de *Hoxd10* y *Hoxd12* en el conejo y el ratón. La pata del conejo expresa fuertemente ambos genes en la zona interdigital detrás del dedo más anterior 2 (flecha). Esto reafirma la utilidad de estos genes para distinguir este dígito del dedo 1, donde la expresión se encuentra ausente. para todos los casos n=6.

***Expresión genética de los genes Hoxd10 y Hoxd11 en alas de embriones tratadas con Ciclopamina.***

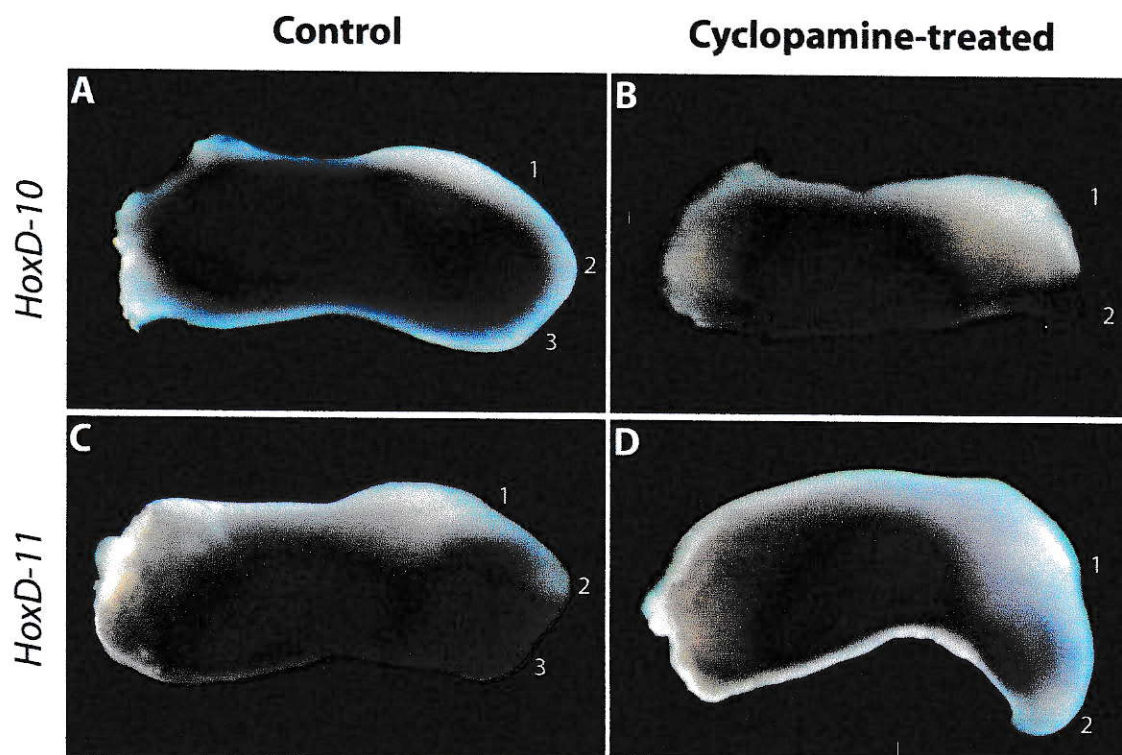
La caracterización de la expresión de estos genes responde a la hipótesis específica 2 sobre la expresión genética en un evento experimental de homeosis en el ala de las aves, y la correspondencia con el patrón de expresión reportado para *Hoxd12* bajo las mismas condiciones experimentales (Vargas y Wagner 2009).

Como se ha reportado previamente, en alas de pollos controles, la expresión de los genes *Hoxd10* y *Hoxd11* se observa ausente solamente en el dígito mas anterior (Figura 8A, 8B), correspondiente morfológicamente al dedo 1 (n=10).

Por otra parte, en los embriones tratados con Ciclopamina, la morfología de los dígitos se ve desplazada una posición embriológica hacia posterior, además de la pérdida inmediata del dígito mas posterior (dedo 3). En estos casos, la expresión de los genes *Hoxd10* y *Hoxd11*, también se ve desplazada una posición hacia posterior y se encuentra ausente solamente en el dígito mas anterior (n=10; Figura 8C, 8C). Esto indica que el cambio de expresión genética, al igual que el cambio morfológico, inducido por la administración de Ciclopamina, ocurre inmediatamente en una

sola generación, sin necesidad de una pérdida gradual de los dígitos.

Este patrón observado es el mismo que fue reportado por Vargas y Wagner (2009) para *Hoxd12*, lo cual indicaría que la expresión de estos tres genes están correlacionados con la identidad digital en el ala del pollo, y por ende, sirven como diagnóstico al comparar con otros amniotes.

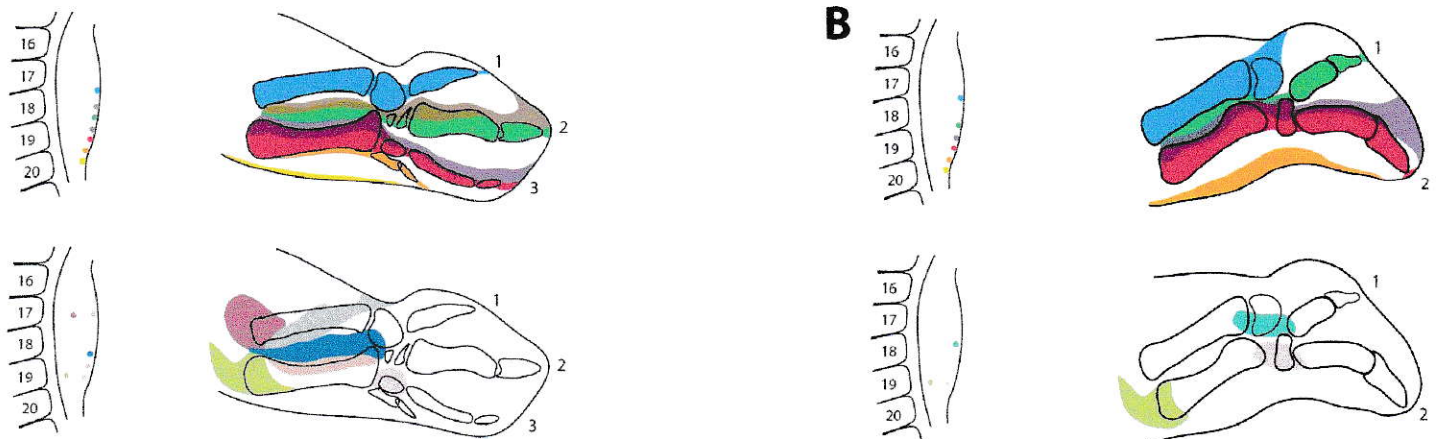


**Figura 8.** Expresión de *Hoxd10* y *Hoxd11* en alas de embriones de pollo, de 7 días de desarrollo, controles y tratados con Ciclopamina. En todos los casos la expresión de estos genes se encuentra ausente solamente en el dígito 1. Al igual que *Hoxd12*, la expresión de *Hoxd10* y *Hoxd11* se desplaza una posición digital hacia posterior. Para todos los casos n=10.



### ***Mapeo de destino celular***

Mediante estos resultados se caracterizaron las células precursoras de los dígitos del ala del pollo, por lo que el destino celular se observó a partir del marcaje celular realizado en los estadios HH18-19, tanto para embriones controles como tratados con Ciclopamina. Al inyectar una cantidad que genera un marcaje de mayor tamaño, con respecto a los trabajos de Vargesson y Sato (30-50 $\mu$ m; Vargesson y col. 1997, Sato y col. 2007), se logró marcar tanto las regiones autopodiales como zeugopodiales del ala, especialmente el eje primario. Los resultados de los distintos mapeos de destino celular fueron observados al día 7 de desarrollo, los cuales se encuentran diagramados en la Figura 9 y en la Tabla 2. Estos resultados son equivalentes a los resultados obtenidos por otros autores (Vargesson y col. 1997 y Sato y col. 2007, Towers y col. 2011), lo cual permite la comparación entre estos trabajos y el presentado en esta tesis.

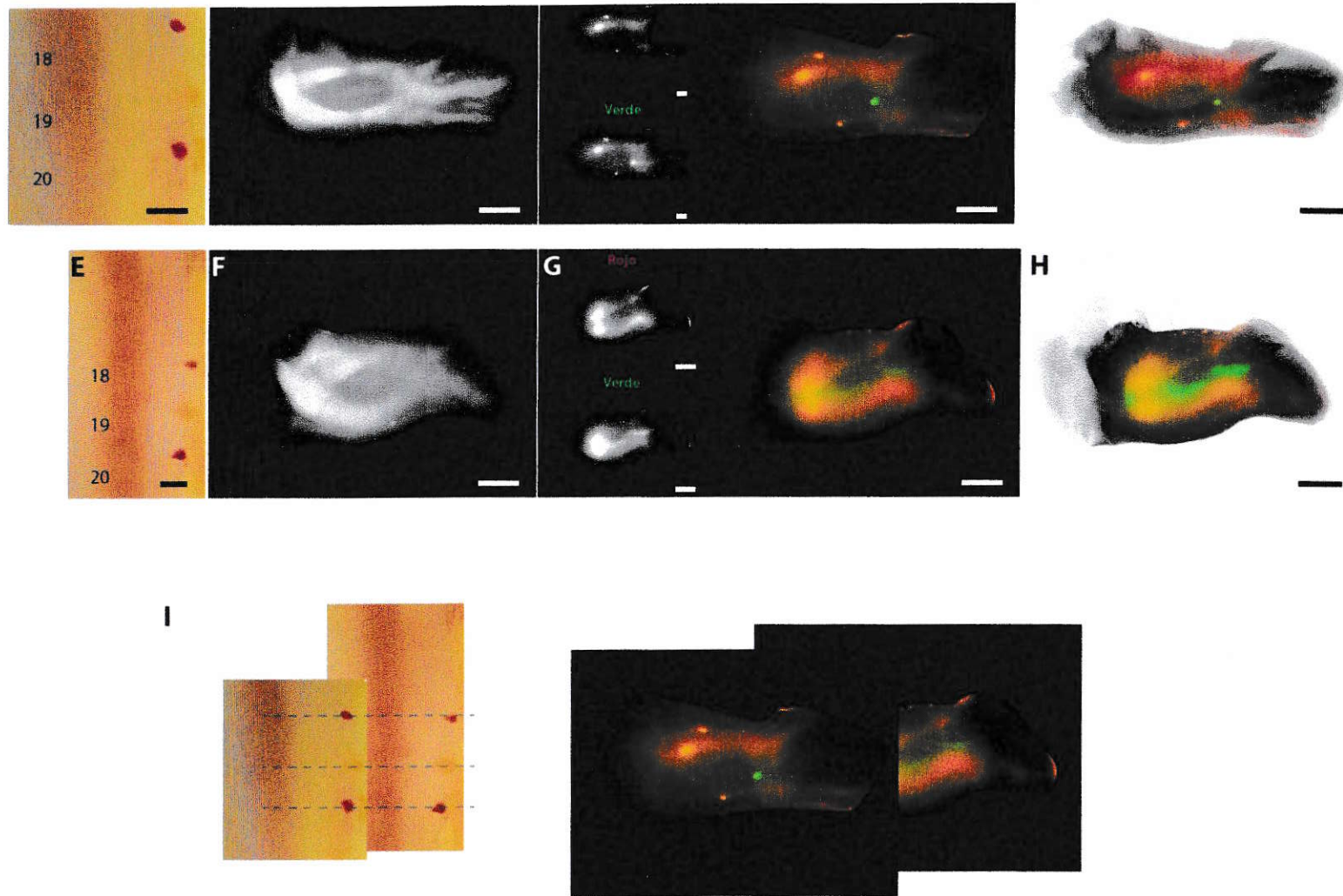


**Figura 9.** Dibujo esquemático en donde se representa los sitios de inyección (círculos de colores) junto con los resultados obtenidos del mapeo de destino celular en alas de embriones controles (A) y tratados con Ciclopamina (B).

**Tabla 2.** Número de veces que se obtuvo el mismo resultado para cada uno de los sitios de inyección (diagramados en la Figura 9) para embriones controles y tratados con Ciclopamina (+Cyc). n/a: no aplicado.

	Control	+ Cyc
●	11	5
●	4	n/a
●	16	10
●	2	6
●	30	26
●	4	1
●	6	1
●	1	n/a
●	2	n/a
●	3	n/a
●	n/a	2
●	2	n/a
●	1	1
●	2	1





**Figura 10.** Mapeo de destino celular del ala en embriones controles y tratados con Ciclopamina (Cyc). A y E, triple marcaje con DiI y DiO de los precursores de los dígitos en el estadio HH18. En embriones controles (A-D) las células marcadas entre los somitos 17/18 se desarrollan en el dígito 1, las células marcadas entre los somitos 18/19 forman el dígito 2, y las células marcadas entre los somitos 19/20 desarrollan el dígito 3. En embriones tratados con Cyc (E-H) las células marcadas entre los somitos 17/18 no se desarrollan en ningún dígito, las células marcadas entre los somitos 18/19 forman el dígito 1, y las células marcadas entre los somitos 19/20 desarrollan el dígito 2. D y H corresponden a la sobreposición de las imágenes B+C y F+G, respectivamente. En C y G se muestran ambos canales, rojo y verde, por separado. En el canal verde ambos marcadores, DiI y DiO, emiten fluorescencia. I, alineamiento entre el caso control (izquierda) y el tratado con Ciclopamina (derecha) donde se muestra la equivalencia de las posiciones embriológicas inyectadas. Los resultados se observaron al día 7 de desarrollo. Barra de escala: (A y E) 300  $\mu\text{m}$ , (B-D) 1 mm, (F-H) 1mm.

En embriones controles, las células que se encuentran en la región sub-apical entre los somitos 17/18, posteriormente se desarrollan en el Radio, Radiale y dígito 1 (n=11; Figura 9A y 10A-10D). El dedo 2 se desarrolla a partir de células ubicadas en la zona sub-apical entre los somitos 18/19 (n=16; Figura 9A y 10A-10D). Células marcadas entre los somitos 19/20 en la región sub-apical, forman el eje primario: Ulna, Ulnare, y dígito 3 (n=30; Figura 9A y 10A-10D).

Por otro lado, en los embriones tratados con Ciclopamina, las células que se encuentran en la región sub-apical entre los somitos 17/18, posteriormente se desarrollan en el Radio y Radiale. A diferencia de los resultados obtenidos, a partir de embriones controles, éstas células no desarrollan dígito alguno (n=5; Figura 9B y 10E-10H). La marca de las células ubicadas en la zona sub-apical entre los somitos 18/19, se encuentra distribuida en el cartílago de un dígito con la morfología bifalangeal característica del dedo 1 (n=10; Figura 9B y 10E-10H). Células marcadas entre los somitos 19/20 en la región sub-apical, al transcurso del desarrollo forman el eje primario, pero con la excepción que forman un dedo con morfología digital 2 en

vez de la correspondiente a un dedo 3 (n=26; Figura 9B y 10E-10H), como es el caso de los embriones controles.

Otro punto a resaltar, es que los embriones tratados con ciclopamina conservan las identidades de los elementos del zeugópodo (ulna y radio) y sus relaciones espaciales en comparación con los embriones controles, indicando que los cambios observados al aplicar este alcaloide afecta solo a las identidades digitales y no al "limb bud" completo.

Estos resultados son concluyentes, indicando que es mecanísticamente posible que posiciones mas posteriores equivalentes de la región sub-apical del "limb bud" puedan desarrollar estructuras digitales mas anteriores (Figura 10I).

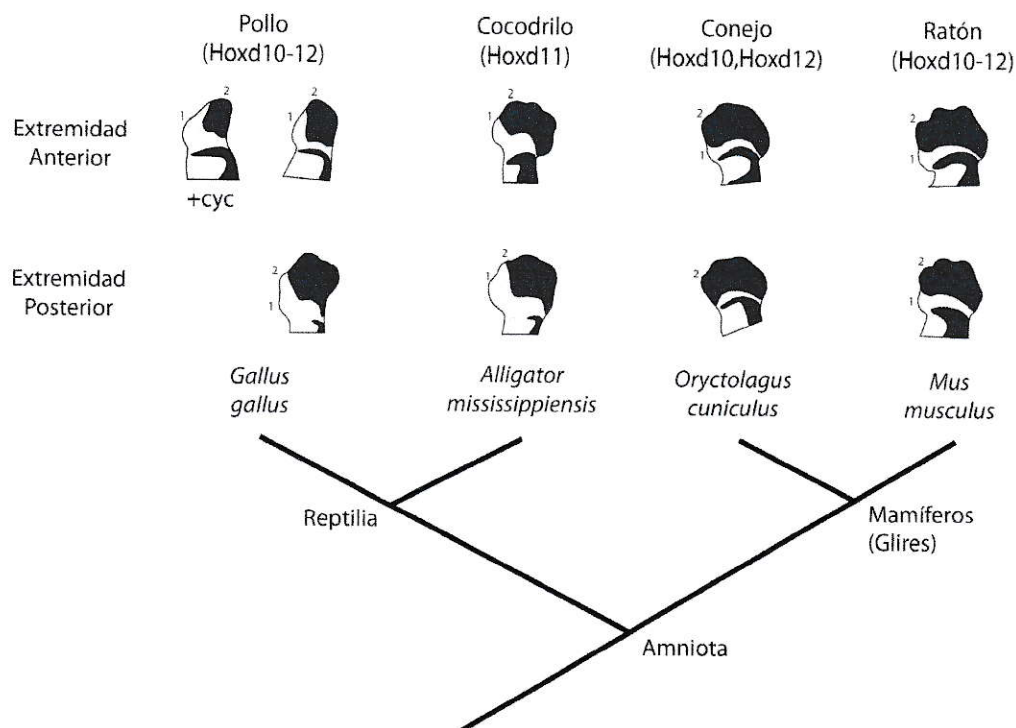
## DISCUSION

### *Mesénquima interdigital e identidad digital*

Trabajos sobre la determinación de la identidad digital a lo largo del eje antero-posterior han revelado que las condensaciones digitales permanecen indiferenciadas hasta estadios tardíos, siendo posible la alteración de su identidad mediante la implantación de otra zona de mesénquima interdigital distinta a la que le da la identidad a dicha condensación (Dahn y Fallon 2000, Gilbert 2003). De esto se concluye que el mesénquima interdigital posterior es quien especifica cada identidad, de tal manera que los genes involucrados en la especificación digital, como son los genes *Hoxd* tardíos, se expresan en las zonas interdigitales de los dígitos que especifican.

En los resultados presentados previamente para embriones de pollo tratados con Ciclopamina (Figuras 5 y 8) y para embriones de conejo (Figura 7), los genes *Hoxd* observados se expresan en la zona interdigital posterior de los dígitos, a excepción de la del dígito 1.





**Figura 11.** Expresión de los genes *Hoxd10-12* en los dígitos reportados en embriones de pollo, cocodrilo, conejo, y ratón. En todos ellos, el dígito 1 es el único dedo que no presenta expresión de estos genes, indicando una conservación de este patrón de expresión a lo largo de la filogenia. +Cyc: alas tratadas con Ciclopamina.

Trabajos previos han reportado este mismo patrón de expresión de los genes *Hoxd* en las extremidades del embrión de ratón (Burke y col. 1995), de cocodrilo (Vargas y col. 2008), y de pollos controles (Nelson y col. 1996). En todos estos casos, el dedo 1 es el único dígito que no presenta expresión de estos genes en el mesénquima interdigital circundante (Figura 11). Esto sugiere que existe una



conservación de la relación entre el patrón de expresión genética y la identidad de la morfología digital.

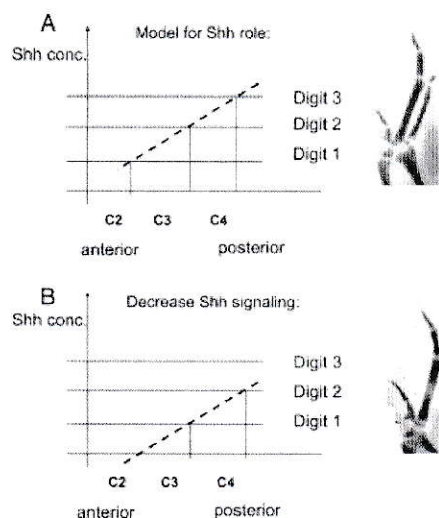
Por otra parte, la hipótesis sostenida por Duboule (Woltering y Duboule 2010) sugiere que la pérdida de el dígito 1 (o el dígito más anterior) en una extremidad, gatillarían el cese de la expresión de los genes *Hox* en el dedo 2 y, por ende, la expresión de estos genes no se puede utilizar para trazar relaciones de homologías entre los dígitos. Sin embargo, los resultados de la expresión de los genes *Hoxd* en el conejo muestran todo lo contrario a lo propuesto por estos autores. A pesar de la pérdida digital, la expresión de los genes *Hoxd10* y *Hoxd12* en los dígitos 2 al 5 se mantiene (figura 7), indicando que el patrón de expresión de estos genes es un buen parámetro para evaluar la identidad digital en la filogenia.

### ***Gradiente de Sonic hedgehog, Ciclopamina e identidad digital***

Vargas y Wagner (2009) a partir de sus experimentos proponen un modelo en donde la aplicación de Ciclopamina (Cyc) induce un "frame-shift", y por ende el cambio de identidad digital (Figura 12). En resumen, este modelo

consiste en que al disminuir la señalización *Shh*, la expresión tardía de los genes *Hox* también se ve desplazada hacia posterior produciendo un corrimiento homeótico de la expresión genética que daría como resultado el cambio morfológico observado.

Como se mencionó anteriormente, una manera experimental de disminuir la señalización de *Shh* y, por ende, afectar a la especificación y crecimiento digital, es mediante la aplicación de *Cyc*, alcaloide orgánico que se une directamente a *Smoothened* (*Smo*). La intensidad de esta unión varía de acuerdo al contexto en que la célula se encuentre (Chen y col. 2002): regiones celulares en donde exista una alta concentración de *Ptc1*, la cantidad presente del complejo *Cyc-Smo* es mayor en comparación a regiones en donde *Ptc1* se encuentre en menores cantidades. Por otra parte, a medida que aumenta la concentración de *Shh*, la unión *Cyc-Smo* se debilita y, por consiguiente, la cantidad presente de este complejo disminuye. Considerando esto y el hecho de que el "limb bud" posee distintas concentraciones de *Shh* y *Ptc1* a lo largo del eje antero-posterior, la administración de *Cyc* al embrión producirá, entonces, un bloqueo gradual de la señalización de *Shh*.



**Figura 12.** Modelo propuesto por Vargas y Wagner (2009) para un evento de frame-shift homeótico inducido por Ciclopamina. Al aplicar este alcaloide orgánico, la señalización y su concentración de *Shh* disminuye, alcanzando concentraciones que especifican para un dedo mas anterior (B) en una posición embriológica que normalmente desarrollaría un dedo mas posterior (A).

De este mismo modo, el efecto obtenido al aplicar Cyc al embrión de pollo dependerá del estadio en el cual haya sido aplicado este agente externo, debido a la variación existente en la señalización de *Shh* a lo largo del desarrollo (Scherz y col. 2007, Vargas y Wagner 2009). Efectos que también afectarán, de manera diferencial, a la identidad y el número de los dígitos. Al aplicar Cyc entre los estadios HH18-19, se obtiene una ala didáctica con características morfológicas de los dedos 1 y 2 (Figura 4E; Vargas y Wagner 2009), es decir, al agregar Cyc en dichos

estadios, se alcanzaría los niveles de concentración de *Shh* necesarios para especificar los dígitos más anteriores y no así para el dedo más posterior (Figura 12B). En cambio, si se aplica Cyc entre los estadios HH 20-21, el ala desarrollada presenta una fusión de los dígitos más posteriores (2 y 3) sin cambio de identidad digital (Figura 4G), posiblemente, consecuencia de una menor separación de las células precursoras de los dígitos durante la expansión del "lim bud" (Towers y col. 2011). Esto sugiere fuertemente que, al igual como se ha reportado para el desarrollo de las extremidades del ratón (Zhu y col. 2008), existe un desacople temporal entre los procesos relacionados con la especificación digital y la expansión del "limb bud" como determinante del número digital. Los diversos resultados obtenidos en este trabajo al aplicar Cyc, además de los distintos resultados del mapeo celular realizado posterior a los estadios HH20 (no mostrados), complementan esta hipótesis que también ha sido planteada en trabajos recientes sobre el tema (Harfe y col. 2004, Butterfield y col. 2010, Tamura y col. 2011).

### ***Mapeo de destino celular y desarrollo digital***

El mapeo de destino celular ha sido ampliamente usado para evaluar el linaje celular de los dígitos del ala del pollo (Vargesson y col. 1997, Sato y col. 2007, Towers y col. 2008, Tamura y col. 2011, Towers y col. 2011). Sin embargo, solo los últimos tres trabajos han estado enfocados en la identidad digital en base a su linaje en el desarrollo.

Uno de estos trabajos que fue publicado recientemente (Tamura y col. 2011), aborda este tema con una mirada desde la biología del desarrollo mediante el marcaje del linaje celular, concluyendo que las identidades de los tres dígitos del ala de las aves son 1, 2, y 3. A pesar de esta y otras conclusiones asertivas, dicho trabajo se debe considerar como invalidado, debido a que los estadios en donde se implementaron los procedimientos aplicados provoca que toda conclusión se encuentre fuera de contexto biológico. Principalmente, estos autores realizan el marcaje celular entre los estadios HH 20-23, en donde las células precursoras de los dígitos ya han abandonado la ZAP y su especificación ya ha ocurrido. De acuerdo a la bibliografía existente, la especificación digital ocurre durante los estadios HH 17-19 (Ohuchi y col. 1997, Agarwal y col. 2003, Scherz y col. 2004, Vargas y Wagner 2009,



Butterfield y col. 2010), estadios para los cuales fueron realizados los mapeos de destino celular (Sato y col. 2007 y Vargesson y col. 1997). Luego de estas etapas, las regiones del "limb bud" que originan los dígitos son diferentes. Por lo tanto, las zonas celulares marcadas por Tamura y col. (2011) no corresponden a las regiones digitales planteadas por estos autores en su trabajo.

Trabajos previos realizados por Towers y col. (Towers y col. 2008, Towers y col. 2011) sugieren que para explicar el cambio digital observado en las aves no es válido, ni necesario, "aclamar" un "frame-shift" homeótico. En su primer trabajo sobre el tema (Towers y col. 2008), argumentan que los dígitos posteriores, desarrollados al aplicar Ciclopamina al embrión, provienen de la fusión de células que normalmente darían origen a lo que ellos llaman dedos 3 y 4. No obstante, la interpretación de sus resultados y conclusiones son erróneas, debido a que sus métodos experimentales lo son o no permiten obtener la información necesaria para poder concluir de esta manera. Entre estos errores se destaca que no muestran el estadio ni los sitios en donde realizaron las inyecciones y la aplicación de la Ciclopamina, considerando que en dicha publicación los autores identifican a un embrión de HH23

como si fuera un embrión que se encuentra en HH20. Además, no realizan la comparación morfológica adecuada a sus resultados de marcaje celular (utilizan embriones distintos para cada caso) y observan los resultados en estadios en donde aun no se ha formado ninguna condensación cartilaginosa correspondiente a los dígitos. En cambio, en su segundo y más reciente trabajo (Towers y col. 2011), la mayoría de estos errores son omitidos al cambiar la técnica utilizada: marcaje celular mediante el trasplante de la ZAP marcada con GFP en los estadios HH 18-19, con y sin la administración de Ciclopamina. En este caso, ellos solo marcan el metacarpo vestigial del dedo 4 (que no se desarrolla en un dígito) y no el resto de los dígitos, especulando que lo único que habría ocurrido durante la evolución del linaje hacia las aves es un "axis-shift", y no un "frame-shift". Towers y col. (2011) especulan que el dedo 3 del ala de las aves durante el desarrollo se posicionaría en el eje primario, debido a la "incapacidad" de desarrollar un dígito por parte de la ZAP del ala, comparándola con la ZAP de la pata, la cual posee un dígito 4. Por esta razón, además de una alta tasa de muerte celular presente en la ZAP del ala (como ellos especulan en

dicho trabajo), es que en las aves modernas los dígitos corresponden morfológicamente a los dedos I, II, y III.

Sin embargo, los resultados obtenidos en mi trabajo al aplicar Ciclopamina, comparados con los resultados obtenidos de embriones controles, se contraponen claramente a lo especulado por Towers y col. Aquí se muestra claramente que en el ala del pollo un dígito mas anterior puede desarrollarse de posiciones embriológicas mas posteriores (Figura 10) y que la ZAP (ubicada aproximadamente entre los somitos 19-21) sí forma un dígito, el dígito más posterior. Esto se ve avalado por el hecho de encontrar distribuida la marca no solo en el dígito más posterior, si no que también a lo largo del eje primario, indicando que ambas estructuras provienen del mismo grupo celular marcado (Figura 10). Por otra parte, si se observa el destino celular de las células precursoras del dígito 1 (células de la zona sub-apical entre los somitos 17/18; Figuras 9 y 10), en embriones controles y tratados con Ciclopamina, en estos últimos la única estructura que no se desarrolla a partir de este grupo celular marcado es el dígito 1 que se desarrolla a partir de células que normalmente darían origen a un dedo 2 (Figuras 9B, 10E-10H, y 10I).

Es decir, al inducir un corrimiento homeótico mediante la aplicación de Ciclopamina entre los estadios HH18-19, los cambios observados ocurren a nivel autopodial, en donde se produce un cambio de identidad digital y no un cambio posicional con respecto al eje primario. En este escenario, opuesto al especulado por Towers y col. (2011), un "frame-shift" homeótico es la explicación mas adecuada (biológica y mecanísticamente hablando) para lo observado, más que un "axis-shift". En cuanto a la tasa de apoptosis en el ZAP del ala del pollo, aún no se ha evaluado al aplicar Ciclopamina y puede ser que entregue mas información sobre este punto. Sin embargo, este mismo grupo de autores ya han mostrado anteriormente que las zonas de apoptosis en la zona posterior del ala se encuentran fuera de la ZPA (Sanz-Ezquerro y Tickle 2000), lo cual es confirmado posteriormente por otros autores (Fernández-Terán y col. 2006), quienes muestran una gran zona necrótica en el borde anterior del bud y no en el borde posterior como lo especula Towers y col. (2011) para los estadios en donde ocurre la expansión del "limb bud" (HH20-21).



***Evolución de la morfología digital hacia el linaje de las aves y la hipótesis del frame-shift homeótico***

Como se mencionó anteriormente, a lo largo del registro fósil se puede apreciar la conservación de la fórmula falangeal en los dígitos de amniotes pentadáctilos, especialmente entre reptiles y aves tempranas como *Archaeopterix*, la cual comparte varias características y esta relacionada muy cercanamente con dinosaurios terópodos como *Deinonychus* (Figura 1). *Archaeopterix* mantiene en su mano características reptoriales de terópodos maniraptores basales y otras características que lo relacionan junto con los terópodos dinosaurios, como el largo y forma de los dígitos, falanges, y metacarpos (Wagner y Gauthier 1999, Vargas y Fallon 2005b).

Por otro lado, los dígitos de las aves actuales se encuentran bastante reducidos y altamente modificados. No obstante, al igual que *Archaeopterix*, aun conservan características que los relacionan con terópodos, como son ciertas características de los metacarpos. Esta reducción digital, también se ha observado a lo largo del linaje de los terópodos, donde el cuarto metacarpo prácticamente se



pierde (en algunas aves como el pollo permanece de manera vestigial) y el tercer dígito se vuelve mas corto que el segundo.

Descubrimientos fósiles de aves mesozoicas proveen antecedentes sobre la transición desde *Archaeopterix* hacia las aves modernas (Neornithes) y las modificaciones en sus dígitos (Vargas y Fallon 2005b). Dentro de las aves mesozoicas, las Ornithothoraces (que incluye el grupo extinto Enantiornithes y los ancestros de las aves modernas) presentan reducción del numero de falanges del dedo 3, de cuatro falanges a solamente una falange. No obstante, las aves retienen la presencia de dos y tres falanges en el primer y segundo dígito (Figura 1), respectivamente, como se observa en embriones de pato, pollo y en las alas de un Hoatzin (*Opisthocomus*) recién eclosionado. Estas y otras evidencias provenientes del registro fósil dan cuenta del alto grado de homología existente entre la morfología de los tres dígitos de las aves modernas y los primeros tres dígitos de amniotos pentadáctilos.

A pesar que el registro fósil bastaría para dilucidar el problema de la identidad digital en el ala de las aves, dichas evidencias no son suficiente para concebir mecanísticamente este proceso. La hipótesis del "frame-shift" homeótico (evaluada en el presente trabajo) aborda el problema desde este punto de vista e implica tres eventos: (1) La presencia de un corrimiento posicional de manera correspondiente entre la morfología digital adulta y el patrón de formación de cartílago (Wagner y Gauthier 1999). (2) Junto con la morfología, la expresión de los genes *Hoxd10*, *Hoxd11*, y *Hoxd12*, también presentan un corrimiento de una posición digital hacia posterior (Vargas y Fallon 2005b, Vargas y col. 2008). (3) Células anteriores, que poseen el potencial de desarrollarse en un dígito, permanecen sin especificar; una condensación vestigial se desarrolla a partir de esta posición vacante (Larsson y Wagner 2002). Todos estos eventos fueron observados y replicados al realizar los experimentos con Ciplopamina, especialmente los correspondientes al mapeo del linaje celular, que entrega una prueba más conclusiva de cómo sería el mecanismo por el cual este "frame-shift" homeótico ocurre.

## CONCLUSIONES

Esta tesis corresponde a uno de los pocos estudios en evaluar el linaje celular de los tres dígitos presentes en el ala del pollo, tanto en embriones controles como en embriones tratados con Ciclopamina. Ambos casos fueron enfocados en diagnosticar la factibilidad mecanística de la hipótesis del "frame-shift" homeótico, propuesta para explicar el problema de la identidad digital en las aves.

Los resultados muestran que al aplicar Ciclopamina, tanto la identidad digital como la expresión de los genes *Hox* en el ala se desplazan una posición embriológica hacia posterior. Estos cambios suceden simultáneamente en una generación, obteniendo alas didáctilas con morfologías digitales anteriores que se desarrollan a partir de condensaciones cartilaginosas más posteriores. Esto sugiere que no es necesario un desplazamiento o una pérdida gradual de los dígitos para explicar el cambio morfológico observado en las aves.

Por otra parte, este trabajo es el primer estudio en caracterizar la expresión de los genes *Hox* en un amnioto actual que ha perdido el dígito más anterior en alguna de sus extremidades, situación homologable al ceratosaurio *Limusaurus* descrito por Xu (Xu y col. 2009Xu y col. 2009). Dichos resultados indican que la pérdida digital no es suficiente para producir un cambio en la especificación del resto de los dígitos, los cuales conservan el patrón de expresión descrito en otros amniotes para las mismas identidades digitales.

En conclusión, de acuerdo a mis resultados, la ocurrencia de un "frame-shift" homeótico como una explicación al problema de la identidad digital en el ala de las aves, no es solo mecanísticamente posible sino que también es consistente con la expresión de los genes *Hox*.

## BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, P., Wylie, J., Galceran, J., Arkhitko, O., Li, C., Deng, C., Grosschedl, R. y Bruneau, B. 2003. Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 130: 623-633.
- Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A. y Tabin, C. 1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development (Cambridge, England)* 121: 333-346.
- Butterfield, N. C., McGlenn, E. y Wicking, C. 2010. The molecular regulation of vertebrate limb patterning. *Current topics in developmental biology* 90: 319-341.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. y Beachy, P. A. 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & development* 16: 2743-2748.
- Cobb, J. y Duboule, D. 2005. Comparative analysis of genes downstream of the Hoxd cluster in developing digits and external genitalia. *Development (Cambridge, England)* 132: 3055-3067.
- Dahn, R. D. y Fallon, J. F. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 289: 438-441.
- Fernández-Terán, M. A., Hinchliffe, J. R. y Ros, M. A. 2006. Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Developmental dynamics* 235: 2521-2537.
- Gilbert, S. F. 2003. Chapter 16: Development of the tetrapod limb. En *Developmental Biology* (7th ed.). pp. 523-546. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- Hamburger, V. y Hamilton, H. L. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 195: 231-272.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. y Tabin, C. J. 2004. Evidence for an Expansion-Based Temporal Shh Gradient in Specifying Vertebrate Digit Identities. *Cell* 118: 517-528.
- Larsson, H. C. E. y Wagner, G. P. 2002. Pentadactyl ground state of the avian wing. *The Journal of experimental zoology* 294: 146-151.



- Li, S. y Muneoka, K. 1999. Cell migration and chick limb development: chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Developmental Biology* 211: 335-347.
- Nelson, C. E., Morgan, B. A., Burke, A. C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L. C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L. F. y Tabin, C. 1996. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development (Cambridge, England)* 122: 1449-1466.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M. y col. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124: 2235-44.
- Sanz-Ezquerro, J. J. y Tickle, C. 2000. Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development (Cambridge, England)* 127: 4811-4823.
- Sato, K., Koizumi, Y., Takahashi, M., Kuroiwa, A. y Tamura, K. 2007. Specification of cell fate along the proximal-distal axis in the developing chick limb bud. *Development* 134: 1397-406.
- Scherz, P., Harfe, B., McMahon, A. y Tabin, C. 2004. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* 305: 396-399.
- Scherz, P., McGlenn, E., Nissim, S. y Tabin, C. 2007. Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Developmental Biology* 308: 343-354.
- Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiha-Takeuchi, K. y Ogura, T. 2004. Tbx genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling. *Developmental Cell* 6: 43-53.
- Tamura, K., Nomura, N., Seki, R., Yonei-Tamura, S. y Yokoyama, H. 2011. Embryological evidence identifies wing digits in birds as digits 1, 2, and 3. *Science* 331: 753-757.
- Tickle, C. 2006. Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nature reviews Molecular cell biology* 7: 45-53.
- Towers, M., Mahood, R., Yin, Y. y Tickle, C. 2008. Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 452: 882-6.

- Towers, M., Signolet, J., Sherman, A., Sang, H. y Tickle, C. 2011. Insights into bird wing evolution and digit specification from polarizing region fate maps. *Nature communications* 2: 426.
- Vargas, A. y Wagner, G. 2009. Frame-shifts of digit identity in bird evolution and Cyclopamine-treated wings. *Evolution & Development* 11: 163-169.
- Vargas, A. O. y Fallon, J. F. 2005a. Birds have dinosaur wings: The molecular evidence. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 304: 86-90.
- Vargas, A. O. y Fallon, J. F. 2005b. The digits of the wing of birds are 1, 2, and 3. A review. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 304: 206-19.
- Vargas, A. O., Kohlsdorf, T., Fallon, J. F., Vandenbrooks, J. y Wagner, G. P. 2008. The evolution of HoxD-11 expression in the bird wing: insights from *Alligator mississippiensis*. *PLoS One* 3: e3325.
- Vargesson, N., Clarke, J. D., Vincent, K., Coles, C., Wolpert, L. y Tickle, C. 1997. Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression. *Development* 124: 1909-18.
- Wagner, G. P. y Gauthier, J. A. 1999. 1,2,3 = 2,3,4: a solution to the problem of the homology of the digits in the avian hand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5111-5116.
- Woltering, J. M. y Duboule, D. 2010. The origin of digits: expression patterns versus regulatory mechanisms. *Developmental Cell* 18: 526-32.
- Xu, X., Clark, J. M., Mo, J., Choiniere, J., Forster, C. A., Erickson, G. M., Hone, D. W. E., Sullivan, C., Eberth, D. A., Nesbitt, S. y col. 2009. A Jurassic ceratosaur from China helps clarify avian digital homologies. *Nature* 459: 940-4.
- Zákány, J., Kmita, M. y Duboule, D. 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304: 1669-1672.
- Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M.-T., Bao, X., Akiyama, H. y Mackem, S. 2008. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Developmental Cell* 14: 624-632.