

UCH-FC
MAG-EBE
C123
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

“Tras las huellas de *Urbilateria*
o bien,
Evolución de la red génica implicada en el desarrollo de
apéndices en artrópodos (*Drosophila melanogaster*)
y vertebrados (*Danio rerio*)”

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
Darko Davor Cotoras Viedma
Julio, 2009

Director de Tesis: Miguel Allende
Co-director de Tesis: Verónica Cambiazo

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

DARKO DAVOR COTORAS VIEDMA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Julio de 2009.

Director de Tesis

Dr. Miguel Allende

Co-Director de Tesis

Dra. Verónica Cambiazo

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Verónica Palma

Dr. Álvaro Glavic

Miguel Allende

Verónica Cambiazo

Verónica Palma

Álvaro Glavic

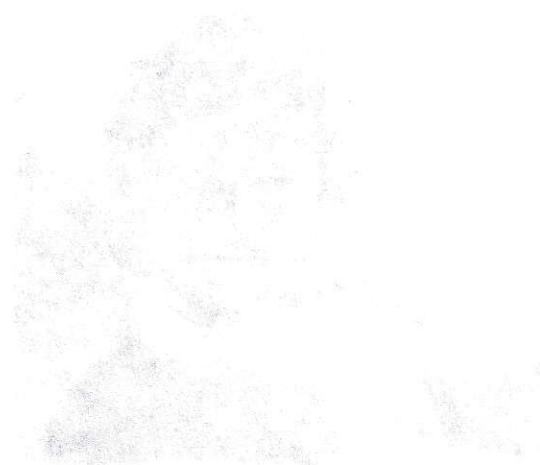




“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.”

última frase de “On the origin of Species”
Charles Darwin, 1859.

... de la vida ...



... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...
... de la vida ...

*A mis papás, quienes me mostraron la maravilla de la vida
y a mis hermanos con quienes la comparto.*

agradecimientos al Profesor Rodrigo Ramos y Fernanda Valdovinos por explicarme y ayudarme a analizar la red como un sistema complejo. Además, al Profesor Mauricio Canals y Andrea Canals por ayudarme con los tratamientos estadísticos.

Por otro lado, quiero agradecer a los profesores Eric Weinberg, University of Pennsylvania (β -*catenina-1* y β -*catenina-2*); Naoto Ueno, National Institute for Basic Biology - Japón (*actrIIa*, *actrIIb*, *bmpr1*); Miguel Concha, Universidad de Chile (*arx*); Tae-Lin Huh, Kyungpook National University (*fz8a*) y H. Rosemary Kim, University of Sheffield (*disp1* y *disp2*) quienes amablemente facilitaron los clones necesarios para efectuar las hibridaciones *in situ*.

Durante el desarrollo de la tesis, además tuve la oportunidad de compartir ideas y conversar con varias personas. Partiré agradeciendo enormemente a Alexander Vargas. Muchas gracias por todas las motivantes y entretenidas conversaciones, por el trabajo realizado y el paper recomendado... 1,2,3=2,3,4. Por otro lado, quiero agradecer a Pablo Razeto una serie de agradables conversaciones centradas en la tasa evolutiva y el rol de los genes. También al Profesor Carlos Medina, conversando con él aprendí a reconocer en la gran cantidad de información disponible una mina de oro para la integración de conocimiento.

Además, querría recordar en esta instancia a todos los peces cebras con los que se trabajó en esta tesis, pues su estudio es el que ha permitido lo aquí presentado.

Finalmente y por haber tenido un rol transversal en todo el desarrollo del trabajo quiero expresar mi mayor agradecimiento a mi querida familia. Papá, Mamá, Vesna y Petre, gracias por acompañarme siempre, por escuchar avances y obstáculos, ayudarme a encontrar soluciones o ver las cosas de otra manera. Gracias por hacer que fuese tan feliz esta etapa de formación.

Gracias a todos por todo. ¡Nuevamente, quedó bien el pastel de frambuesa!

Darko D. Cotoras Viedma
Santiago, Chile
Agosto, 2009

Financiamiento: Programa Iniciativa Científica Milenio, Núcleo Milenio Centro para la Genómica de la Célula. Código del Proyecto P06-039F



Índice de materias



Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de materias	v
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Introducción	1
1.- ¿Cómo se cree que fué el <i>Urbilateria</i> ?	3
2.- Los apéndices de <i>Urbilateria</i>	6
3.- Apéndices de artrópodos	7
3.1.-Constitución ancestral de los apéndices en insectos	8
3.2.- Desarrollo de la pata de <i>Drosophila</i>	10
4.- Apéndices de vertebrados	11
4.1.- Hipótesis sobre el origen de las extremidades en vertebrados	12
4.2.- Desarrollo de la aleta pectoral del pez cebra	14
5.- Herramientas bioinformáticas de investigación	16
6.- Hipótesis, Objetivos y Relevancia de la Investigación	19
Materiales y Métodos	22
1.- Trabajo Teórico/Bioinformático	22
1.1.- Modelos de estudio	22
1.2.- Construcción de las redes	22
1.3.- Primer nivel de comparación de las redes de interacciones: literatura	28
1.4.- Segundo nivel de comparación de las redes de interacciones: BLAST bidireccional	28
1.5.- Construcción de la red de interacciones génicas conservadas	31
1.6.- Análisis cuantitativo de las redes de interacción génica	32
2.- Trabajo Experimental	34
2.1.- Preparación de sondas de RNA para hibridación <i>in situ</i>	34
2.2.- Hibridación <i>in situ</i>	37
2.3.- Inmunohistoquímica en embriones completos	38
2.4.- Fotografías	39
Resultados	40
1.- Redes de interacción génica	40
2.- Resultados BLAST bidireccional	44
3.- Comparación de la red génica implicada en el desarrollo de las extremidades de vertebrados e insectos	45
3.1.- Vías de señalización canónicas	45
3.2.- Factores de transcripción y otros genes conservados	51
4.- Análisis cuantitativo de las redes	55
5.- Genes candidatos a buscar	61
5.1 <i>bar</i>	62
5.2 <i>saxophone (sax)</i>	65
5.3 <i>punt</i>	69

5.4 <i>frizzled</i> (<i>fz/fz2</i>)	72
5.5.- <i>tick-veins</i> (<i>tkv</i>)	73
7.- Evidencias de la activación de una vía de señalización	74
Discusión	77
1.- Construcción de las redes de interacción génica	79
1.1.- Modelos utilizados	79
1.2.- Forma de construir la red	80
2.- Comparación de las redes	81
2.1.- ¿Qué comparar y qué considerar?	81
2.2.- Comparación cualitativa de las redes	84
2.3.- Comparación cuantitativa de las redes	88
3.- Trabajo bioinformático	91
4.- Trabajo experimental	92
4.1.- Patrones de expresión encontrados por hibridación <i>in situ</i>	92
4.2.- Evidencia de la actividad de una vía de señalización: Presencia de pSmad	96
5.- Panorama general de los resultados experimentales	97
6.- Comparación con lo descrito en la literatura	98
7.- Las patas de la mosca y las aletas del pez: ¿Homología o analogía?	103
8.- Proyecciones y líneas futuras	104
Conclusiones	106
Bibliografía	107
Bases de Datos	120
Apéndices	121



Lista de Tablas

Tabla 1: Genes a buscar en pez cebra	30
Tabla 2: Clones utilizados y sus respectivas enzimas de restricción y RNA polimerasas	36
Tabla 3: Concentraciones y tiempos de incubación con Proteinasa K dependiendo del tiempo de desarrollo	37
Tabla 4: Proteínas conservadas no encontrados en la revisión bibliográfica	44
Tabla 5: Descriptores básicos de las redes	55
Tabla 6: Coeficientes de correlación (R^2) de los distintos gráficos construidos	56
Tabla 7: Análisis de covarianza para comparar la homogeneidad de las pendientes de los gráficos generados a partir de las matrices de interacciones totales.	61
Tabla 8: Cálculo del promedio de interacciones por nodo	61
Tabla 9: Conservación de la red de interacciones de <i>bar</i>	63
Tabla 10: Conservación de la red de interacciones <i>punt</i>	69
Tabla 11: Conservación de la red de interacciones de <i>fz/fz2</i>	72
Tabla 12: Conservación de la red de interacciones de <i>tkv</i>	73



Lista de Figuras

Figura 1: Posible ubicación filogenética y características de <i>Urbilateria</i>	4
Figura 2: Modelo propuesto para la consitución ancestral de los apéndices de insecto	10
Figura 3: Disco imaginal y pata adulta de <i>Drosophila</i>	11
Figura 4: Diversidad de extremidades en vertebrados	12
Figura 5: Esquemas de las hipótesis del origen de las extremidades en vertebrados	15
Figura 6: Desarrollo de la aleta pectoral de pez cebra	15
Figura 7: Ilustraciones de las Reglas Básicas utilizadas para construir las redes	27
Figura 8: Explicación de la construcción de gráficos	35
Figura 9: Red de Interacciones génicas asociadas a la formación de la pata de <i>Drosophila</i>	41
Figura 10: Red de Interacciones génicas asociadas a la formación de la aleta pectoral de pez cebra	43
Figura 11: Red de Interacciones génicas conservadas asociadas a la formación de extremidades	54
Figura 12: Gráfico logarítmico de las frecuencias acumuladas estandarizadas versus el grado obtenido desde la matriz de Mosca Completa	57
Figura 13: Gráfico logarítmico de las frecuencias acumuladas estandarizadas versus el grado obtenido desde la matriz de Mosca	58
Figura 14: Gráfico logarítmico de las frecuencias acumuladas estandarizadas versus el grado obtenido desde la matriz de Pez	59
Figura 15: Cladograma correspondiente al gen <i>bar</i>	63
Figura 16: Hibridación <i>in situ</i> de <i>barhl1.1 (barh1)</i> y <i>barhl1.2 (barh3)</i>	64
Figura 17: Cladograma correspondiente a las familias de receptores Tipo I y Tipo II	67
Figura 18: Hibridación <i>in situ</i> masiva (Thisse & Thisse, 2004) de <i>alk8</i>	68
Figura 19: Hibridación <i>in situ</i> de <i>alk8</i>	68
Figura 20: Hibridación <i>in situ</i> de <i>actr11b</i>	71
Figura 21: Hibridación <i>in situ</i> de <i>actr11a</i>	72
Figura 22: Hibridación <i>in situ</i> de <i>fz8a</i>	73
Figura 23: Hibridación <i>in situ</i> de <i>bmpr1a</i>	75
Figura 24: Inmunohistoquímica de pSmad revelada con DAB	76
Figura 25: Inmunohistoquímica de pSmad revelada con anticuerpo secundario fluorescente	76
Figura 26: Modificación de una red en función de nuevo conocimiento	90
Figura 27: Ejemplo de deriva de los sistemas de desarrollo	103

Lista de Abreviaturas

AER	<i>Apical ectodermal ridge</i>
A/P	Anterior/Posterior
<i>actr</i>	<i>activin receptor</i>
<i>ahr</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
<i>al</i>	<i>aristaless</i>
<i>aldh1a2</i>	<i>aldehido deshidrogenasa 1 miembro de la familia a2</i>
<i>antp</i>	<i>antennapedia</i>
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>
<i>arnt</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
<i>bab</i>	<i>bric a brac 1/bric a brac 2</i>
<i>bab</i>	<i>babyface</i>
<i>bmp</i>	<i>bone morphogenic protein</i>
<i>btd</i>	<i>buttonhead</i>
<i>cg</i>	<i>combgap</i>
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>
<i>cklα/ε</i>	<i>caseína quinasa Iα/ε</i>
<i>cll</i>	<i>clawless</i>
D/V	Dorsal/Ventral
<i>dac</i>	<i>dachshund</i>
<i>dac/dach</i>	<i>daschund</i>
<i>dak</i>	<i>dackel</i>
<i>disp</i>	<i>dispatched</i>
<i>dll</i>	<i>distal-less</i>
<i>dpf</i>	Días post fertilización
<i>dpp</i>	<i>decapentoplagic</i>
<i>dsh</i>	<i>dishevelled</i>
EGFR	<i>epidermal grow factor receptor</i>
<i>ehh</i>	<i>echidna hedgehog</i>
<i>el</i>	<i>elbow</i>
<i>en/eng</i>	<i>engrailed</i>
<i>esg</i>	<i>escargot</i>
<i>esg</i>	<i>escargot</i>
<i>exd</i>	<i>extradenticle</i>
<i>fgf</i>	<i>fibroblastic grow factor</i>
<i>fj</i>	<i>four-jointed</i>
<i>fu</i>	<i>fused</i>
<i>fz</i>	<i>frizzled</i>
<i>grn</i>	<i>grain</i>
<i>hand2</i>	<i>heart and neural crest derivatives expressed transcript 2</i>
<i>Hdac-1</i>	<i>histona deacetilasa-1</i>
<i>Hh</i>	<i>hedgehog</i>
<i>hpf</i>	Horas post fecundación
hrs AEL	Horas <i>after egg laid</i>
HSPG	Heparan sulfatos proteoglicanos
<i>hst</i>	<i>heartstrings</i>
<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
<i>klu</i>	<i>klumpfuss</i>
<i>l zr</i>	<i>lazarus</i>

MI	Mesodermo intermedio
MS	Mesodermo somítico
<i>nls</i>	<i>neckless</i>
<i>noc</i>	<i>no ocelli</i>
<i>odd</i>	<i>odd-skipped</i>
<i>omb</i>	<i>optomotor blind</i>
<i>otx</i>	<i>orthodenticle</i>
P/D	Próximo/Distal
PBST	PBS con Tween
<i>pbx4</i>	<i>pre-B-cell leukemia transcription factor 4</i>
<i>PKA</i>	<i>proteína quinasa A</i>
PLM	Placa lateral del mesodermo
<i>poxn</i>	<i>pox neuro</i>
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
<i>pygo</i>	<i>pygopus</i>
RA	Ácido retinóico
<i>raldh2</i>	<i>retinaldehido deshidrogenasa 2</i>
<i>rn</i>	<i>rotound</i>
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
<i>sax</i>	<i>saxophone</i>
<i>scr</i>	<i>sex combs reduced</i>
SDD	Deriva de los sistemas de desarrollo
<i>sgg/zw3</i>	<i>shaggy/zeste white 3</i>
<i>shh</i>	<i>sonic hedgehog</i>
<i>slmb</i>	<i>supernumerary limbs</i>
<i>smo</i>	<i>smoothened</i>
<i>spen</i>	<i>splitends</i>
<i>spi</i>	<i>spitz</i>
<i>spry</i>	<i>sprouty</i>
<i>ss</i>	<i>spineless</i>
<i>su(fu)</i>	<i>suppressor of fused</i>
<i>tgo</i>	<i>tango</i>
<i>tkv</i>	<i>tick-veins</i>
<i>trh</i>	<i>trachealess</i>
<i>tsh</i>	<i>teashirt</i>
<i>ttv</i>	<i>toutvelu</i>
<i>twhh</i>	<i>tiggy-winkle hedgehog</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>

RESUMEN

Estudios de la genética del desarrollo en especies lejanas dentro de la filogenia de los animales han demostrado conservación estructural y funcional en genes implicados en la formación de diversas estructuras, muchas de ellas clásicamente consideradas análogas. La existencia de estos genes ha llevado a suponer una serie de posibles atributos en el ancestro de los organismos bilaterales (*Urbilateria*). El objetivo de esta tesis es reconstruir una red génica común a artrópodos y vertebrados asociada al desarrollo de apéndices locomotores. Para ello se revisó la literatura y se efectuó un BLAST bidireccional. Como resultado de este último procedimiento se identificaron 10 genes que inicialmente no habían sido encontrados. Mediante el programa BioTapestry se graficaron dos redes génicas, una asociada al desarrollo de aleta pectoral de pez cebra (64 nodos) y otra la pata de *Drosophila* (59 nodos). En esta última red se incluyeron de manera arbitraria 18 genes participantes en diversas vías de señalización. Se efectuaron análisis cualitativos y cuantitativos a ambas redes detectándose 24 genes conservados, correspondientes al 60% de los genes presentes en la red de *Drosophila*. Entre ellos están algunos participantes en vías de señalización (vía de Hh/Shh, vía de Dpp/Bmp, vía de Wg/Wnt), pequeñas redes de interacción (*hth/meis – exd/pbx – tsh/tsh1* y *ss/ahr – tgo/arn1*) y factores de transcripción (*cll/hox11*, *msh/msx*, *dll/dlx*, *odd/osr2* y *D-sp1/sp8*). Ello sugiere la presencia de modularidad. Por otra parte, los estudios cuantitativos muestran que la conectancia de la red de *Drosophila* es mayor que la del pez cebra. Además, se evidencia que el efecto de haber incluido algunos genes arbitrariamente se relaciona con una disminución en la conectancia global. A continuación se buscó si las redes seguían una ley de distribución de potencia. La regresión lineal hecha a partir de gráficos de doble logaritmo del histograma de frecuencias acumuladas y estandarizadas, de los grados de los nodos, presentan coeficientes de correlación altos ($R^2 > 0,80$). Sin embargo, este modelo pareciera no ser el más adecuado en varios los casos. En base a la información entregada por la red se efectuaron hibridaciones *in situ* en embriones de pez cebra para: *barhl1.1 (barh1)*, *barhl1.2 (barh3)*, *alk8*, *actrIIa*, *actrIIb*, *fz8a* y *bmpr1a*. Dado que se encontró expresión

en la aleta pectoral de *alk8* y *actrIIa*, genes pertenecientes a familias de proteínas receptoras implicadas en la vía de Bmp, se prosiguió con la identificación mediante inmunohistoquímica de la presencia de Smad fosforilado (pSmad) como indicador de la actividad de la vía. Interesantemente, existe evidencia de la presencia de elementos de la vía de Bmp (*dpp*, *sax*, *punt*, *mad*) en el disco imaginal de pata en *Drosophila*. Finalmente, si bien no puede asegurarse la homología histórica entre ambas estructuras, se aporta evidencia teórica y experimental sobre la conservación de parte de la red génica implicada en la formación de las mismas.

ABSTRACT

Studies on the genetics of development in phylogenetically distant animal species have shown structural and functional conservation of genes involved in the formation of various structures, many of which are classically considered analogous. The existence of these genes has led to assume for them a number of possible attributes in the ancestor of bilateral organisms (*Urbilateria*). The objective of this thesis is to reconstruct a common gene network associated with the development of locomotor appendages in arthropods and vertebrates. For this survey, data was obtained by reviewing the literature and by carrying out two-way BLAST analysis. As a result of this procedure, 10 genes that had not been previously found are reported to be conserved and included in the network. Two gene networks were graphically constructed using BioTapestry, one associated with the development of the pectoral fin in zebrafish (64 nodes) and another with the *Drosophila* leg (59 nodes). In the latter network, 18 different genes involved in signaling pathways were included in an arbitrary manner. When the networks were analyzed qualitatively and quantitatively I detected 24 conserved genes, corresponding to 60% of genes present in the *Drosophila* network. Among them are participants in signaling pathways (Hh/Shh pathway, Dpp/Bmp pathway, Wg/Wnt pathway), interaction pairs (*hth/meis* – *exd/pbx* – *tsh/tsh1* y *ss/ahr* – *tgo/arn*) and transcription factors (*cll/hox11*, *msh/msx*, *dll/dlx*, *odd/osr2* y *D-sp1/sp8*). This suggests the presence of modularity. Furthermore, quantitative studies show that the connectivity in the *Drosophila* network is higher than that of zebrafish. I also suggest that the effect of having included some arbitrary genes led to a decrease in overall connectivity. I also analyzed whether networks followed a power law distribution. Linear regression was performed from double logarithm graphs of the histogram of cumulative standardized frequency of the nodes' degrees. High correlation coefficients ($R^2 > 0.80$) were found. However, this regression model appears not to be the most appropriate in various cases. Based on information supplied by the networks we carried out *in situ* hybridizations on zebrafish embryos for the following genes: *barhl1.1* (*barh1*) *barhl1.2* (*barh3*) *alk8*, *actr11a*, *actr11b*, *fz8a* and *bmpr1a*. Since expression of *alk8* and *actr11a*, genes belonging to families of proteins involved in the Bmp pathway, was

found in the pectoral fin, I assayed for the presence of phosphorylated Smad (pSmad), an indicator of the activity of the pathway, by immunohistochemistry. Interestingly, there is also evidence of the presence of the Bmp pathway (*dpp, sax, punt, mad*) in the leg imaginal disc of *Drosophila*. Finally, while there is no formal proof of a historic homology between these two structures, in this thesis theoretical and experimental evidence on the retention of part of the gene network involved in their development has been provided.

INTRODUCCIÓN

El concepto de homología es central en la biología. Resulta esencial para comprender el proceso evolutivo que lleva a la diversificación de los linajes. Clásicamente los principales criterios para establecerla corresponden a: identidad de estructura, constancia en las “conexiones” y mismo origen embrionario; atribuidos a Linné, Saint Hillaire y Owen, respectivamente (revisado por Cecchi y col., 2001). Posteriormente, se ha generado un sin número de criterios para poder determinarla. Esto ha llevado a que, en diversos casos, se llegue a conclusiones diferentes dependiendo del criterio utilizado (de Beer, 1971). En las últimas décadas, el estudio de los patrones de expresión génica y las implicancias fenotípicas de su alteración, se han convertido en un nuevo “rasgo” a considerar al momento de buscar homología.

Todo esto ha llevado a la generación de una conceptualización asociada a este tema. Se han definido como estructuras “homocráticas” aquellas cuyo desarrollo se asocia a un mismo patrón de expresión génica independiente sea consecuencia de convergencia o ancestría común. En tanto se considera una “homología generativa” cuando dos estructuras se forman utilizando una batería génica presente en un ancestro común carente de dicha estructura (revisado por Sanetra y col., 2005). A un fenómeno similar, Shubin y col. (1999) lo llaman “homología profunda” o *deep homology*. En tanto, referido específicamente a redes génicas se ha acuñado en concepto de “homología parcial”. Éste se refiere a aquellos casos en los que en dos o más linajes se han incluido nuevos elementos a una red existente en el ancestro. De esta manera las nuevas redes presentes en los derivados tienen un estatus de “homólogas parciales” (revisado por Sanetra y col., 2005). Estas nuevas herramientas y conceptualizaciones han permitido que tomen fuerza una serie de debates que habían estado más bien estáticos desde su planteamiento.

Una de estas preguntas corresponde al origen de los planes corporales (Davidson y Erwin, 2006). Un plan corporal corresponde a todas las características que definen la organización del cuerpo de un adulto o la trayectoria de desarrollo que da lugar al mismo. Dentro de estas características se encuentra: esqueleto (hidrostático, interno, externo o ausente), simetría (bilateral, radial, asimétrico), número de pares de apéndices, cavidad corporal (acelomados, pseudocelomados, celomados), patrón de clivaje (espiral, radial, sincicial, etc.) y segmentación corporal (presente o ausente) (Wallace, 1997). Estas características se han usado para determinar clasificaciones taxonómicas a nivel de phylum en los animales. De hecho, los phyla son definidos por incluir animales que comparten un mismo plan corporal.

Uno de los criterios recién mencionados se asocia a una de las grandes divisiones no taxonómicas de los animales. La clasificación según la simetría. Entre los animales con simetría radial se consideran a los cnidarios, ctenóforos y poríferos (a veces se clasifican como asimétricos), mientras que todos los otros phyla se les agrupa dentro de los organismos bilaterales, los bilateria. Al ancestro común de todos los bilaterias se le ha denominado *Urbilateria* (De Robertis y Sasaï, 1996). Corresponde a un ancestro hipotético más que a un organismo precisamente identificado.

No se conoce con precisión cuando ocurrió la divergencia entre organismos con simetría radial y bilateral, un posible escenario data este evento hace 800 o 750 millones de años, previo a la glaciación Sturtiana. Una segunda posibilidad lo ubica hace aproximadamente 650 millones de años, previo a la glaciación Marinoana. Finalmente una tercera hipótesis lo sitúa justo después de la glaciación Marinoana, entre los 550 y 600 millones de años. De hecho, en este caso coincidiría con la fauna pre-cámbrica encontrada en Doushantuo. Resulta importante mencionar las glaciaciones, debido a que corresponden a fenómenos climáticos de alto impacto global. Las glaciaciones de finales del Neoproterozoico fueron tan intensas que avanzaron hasta latitudes cercanas al ecuador (revisado por Erwin y Davidson, 2002).

El fósil más antiguo con simetría bilateral que se conoce es *Kimberella*, el cual pertenece a la fauna de Ediacara de hace más de 550 millones de años (revisado por Erwin y Davidson, 2002; revisado por Marshall, 2006). Sin embargo, los paleontólogos consideran que incluso este fósil representa una forma derivada, por lo que no correspondería a *Urbilateria*.

Sorpresivamente, datos generados a partir de la biología del desarrollo y de la genómica han revivido con más fuerza la búsqueda de este ancestro común. Pero, esta nueva versión de la búsqueda implica otro tipo de datos, técnicas y alcances. Todo ello, en ningún caso ocupa el lugar de la paleontología, sin embargo abre una nueva forma de ver hacia el pasado.

1.- ¿Cómo se cree que fue el *Urbilateria*?

"I should like to work like the archaeologist who pieces together the fragments of a lovely thing which are alone left to him. As he proceeds, fragment by fragment, he is guided by the conviction that these fragments are part of a larger whole which, however, he does not yet know."
- Hans Spemann (1938)

Las caracterizaciones de *Urbilateria* están basadas en datos funcionales y de expresión génica que han sido encontrados en organismos muy distantes en la filogenia de los animales. Tan distantes, como para fechar su divergencia en el momento mismo de la Explosión Cámbrica hace más de 543 millones de años (revisado por Marshall, 2006) (Fig. 1a). Se ha evidenciado que en varias estructuras genes ortólogos tienen roles similares. Incluso en estructuras que clásicamente han sido consideradas convergencias. De ahí se origina la pregunta sobre si *Urbilateria* poseía estos rasgos fenotípicos o solo los grupos de genes ancestrales que posteriormente se co-optaron en el desarrollo de dichas estructuras. Solamente cuando se encuentre un fósil coincidente con el tiempo de divergencia de los bilateria, se podrá comenzar a resolver esta interrogante.

Urbilateria se ha caracterizado como un organismo, por definición, con simetría bilateral. Éste sería similar a un gusano poseedor de un patrón de segmentación antero/posterior (A/P) y polarización dorso/ventral (D/V). Además, tendría un sistema nervioso centralizado y polarizado y con órganos receptores, posiblemente fotosensibles. Internamente poseería un sistema digestivo regionalizado y un órgano que serviría como bomba circulatoria. Externamente, se podrían reconocer estructuras apendiculares (revisado por Marshall, 2006; revisado por Erwin, 2006) (Fig. 1b).

La presencia de un patrón de segmentación antero/posterior se ha deducido de la difundida existencia de los genes Hox en todos los animales y como usualmente se asocian a los segmentos corporales (Swalla, 2006). Relacionado con esto, se encuentra el mecanismo mediante el cual se da la

segmentación del cuerpo. En el caso de los vertebrados corresponde a la segmentación de los somitos mediante el sistema Notch/Delta. Sin embargo, si se compara con la definición de segmentos en *Drosophila* se encontrará una diferencia. Pues en la mosca, los segmentos se definen a través de una sucesión de genes, que van dividiendo el embrión en territorios cada vez más precisos (Gilbert, 2003). Interesantemente, al estudiar la forma en la que se generan los segmentos en una araña (*Cupiennius salei*) se evidencia que, al igual que los vertebrados, utiliza el sistema Notch/Delta (Stollewerk y col., 2003). Situaciones como esta, demuestran que es necesario un muestreo taxonómico más extenso a fin de tener claridad acerca de qué rasgos son efectivamente difundidos y cuales corresponden a particularidades. No obstante, la posibilidad de que *Urbilateria* haya sido un organismo con segmentación corresponde a una hipótesis muy bien fundamentada (Balavoine y Adoutte, 2003).

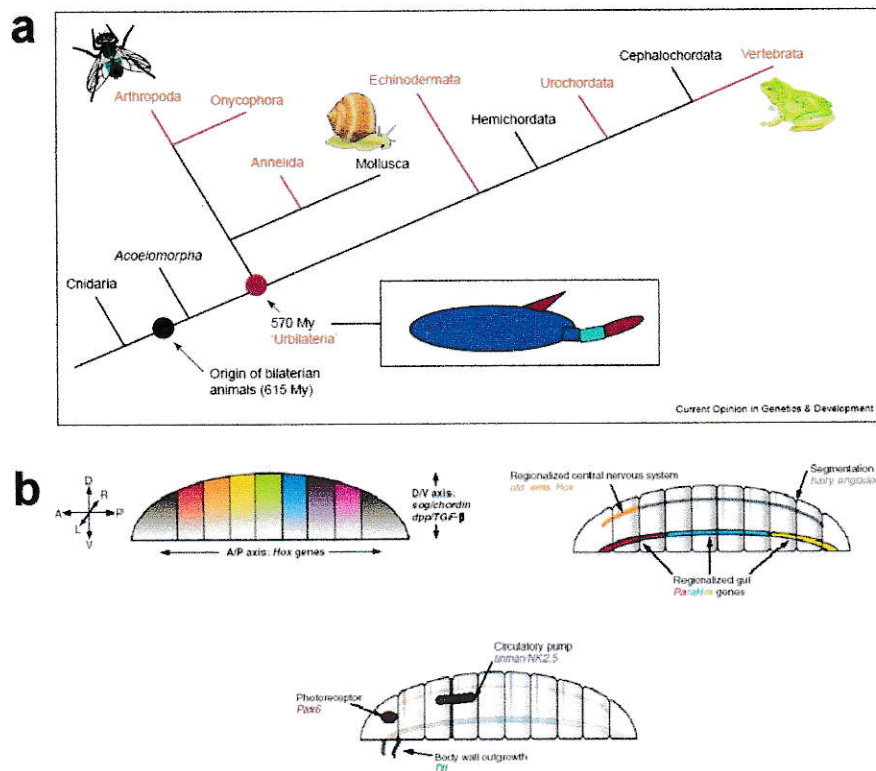


Figura 1: Posible ubicación filogenética y características de *Urbilateria*. (a) Posible ubicación filogenética, ella correspondería a la divergencia de protostomados y deuterostomados (Pueyo y Couso, 2005) (b) Esquema de sus posibles rasgos y los genes a los que se les asocia (modificado de Marshall, 2006).

Por otro lado, asociado al patrón dorso/ventral se han encontrado de manera invertida los mismos genes de polarización en embriones de protostomados y deuterostomados, que estén invertidos hace sentido con el hecho de que en los adultos esta polaridad también lo está (De Robertis, 2008). En un cordado, el sistema digestivo es ventral y el nervioso es dorsal y en un protostomado se encuentra la situación opuesta. Así en los embriones de vertebrados desde dorsal a ventral hay un gradiente de *cordina* (ortólogo de *sog*), mientras que desde ventral a dorsal esta *bmp 4* (ortólogo de *dpp*), en los invertebrados es al revés.

Relacionado con el sistema nervioso, asociados al desarrollo del cerebro se han encontrado conservados genes como *orthodenticle (otx)* (Finkelstein y col., 1990; Acampora y col., 2001) o *apterous (ap)* (revisado por Erwin, 2002). Por otro lado, estudios en gusanos hemicordados han demostrado que la sola presencia de genes típicamente asociados a sistemas nerviosos centralizados, no garantiza que los mismos tengan esta condición. Así, en *Saccoglossus kowalevskii* se mantienen los patrones de expresión antero/posterior típicos del sistema nervioso centralizado que se observan en cordados y artrópodos, pero tiene una red nerviosa difusa (Lowe, 2003). No obstante, lo anterior se ha encontrado que el sistema de polarización dorso/ventral de esta estructura está conservado en los bilateria (revisado por Lichtneckert y Reichert, 2005). Por otro lado, también se encuentra conservación en los sistemas implicados en la navegación axonal (Eph tirosina quinasas, netrinas y sistema de señalización slit/robo) (Kandel y col., 2000).

Relacionado con receptores sensoriales, el ojo es el que más se ha estudiado. Así es como se ha encontrado la conservación de *pax6* o *eyeless*. Este gen al encontrarse mutado en humanos produce la condición conocida como aniridia, entre otros desordenes oculares (Lee y col., 2008). En tanto, en el disco imaginal de ojo en *Drosophila* igualmente hay expresión de este gen (Quiring y col., 1994). Esta conservación es incluso a nivel funcional. De esta manera, se han realizado experimentos en los que la inducción ectópica de *pax6* de ratón produce ojos compuestos en *Drosophila* (Halder y col., 1995).

Actualmente, existen estudios que buscan evidencias sobre el tipo celular al que pertenecería el supuesto ojo presente en *Urbilateria*. Para ello de gran utilidad ha sido el gusano poliqueto *Platynereis dumerilii*. Él perteneciente a la familia Nereididae y posee una morfología muy similar a otros poliquetos

fósiles como *Burgessochaeta*, el cual pertenece a la fauna de Burgess Shale (505 millones de años). En vertebrados, las células fotosensibles son del tipo ciliada, mientras que en invertebrados son rabdoméricas. Interesantemente si bien *P. dumerilii* posee células fotoreceptoras de tipo rabdoméricas, su larva posee ojos fotoreceptores con células tipo ciliadas también. Este caso podría corresponder a un estadio transicional en el cual se podría estudiar la divergencia de ambos tipos celulares en los ojos (Arendt y Wittbrodt, 2001; Arendt y col., 2003).

Referente a la presencia de un sistema digestivo, las evidencias genéticas se asocian al rol de genes como *cdx/caudal* y *bralbyn* implicados en la especificación de la región posterior del intestino. Se ha encontrado su expresión en ratón, *Drosophila* y grillo (*Gryllus bimaculatus*) (Shinmyo y col., 2006).

Una estructura similar a un corazón también se ha postulado para *Urbilateria*. Esta suposición se basa en el hecho que tanto el gen vertebrado *nkx2.5* como su ortólogo en *Drosophila*, llamado *tinman*, se encuentran involucrados en cardiogénesis (Harvey, 1996). Inclusive, se ha descrito una red genética común asociada al desarrollo de corazón a partir de la comparación de lo que se conoce en mosca y ratón (Davidson y Erwin, 2006; Olson, 2006; Pocock y col., 2008). Además, en *Caenorhabditis elegans* el gen *ceh-22*, ortólogo de *nkx2.5*, se encuentra implicado en el desarrollo de músculos faríngeos (Haun y col., 1998). Estas evidencias llevan a concluir que más que un corazón propiamente tal, *Urbilateria* podría haber tenido un tubo muscular pulsátil.

Finalmente, también se ha descrito la posible presencia de apéndices en *Urbilateria*. Uno de los principales argumentos ha correspondido a la presencia del gen *distal-less (dll)* en prácticamente todas las estructuras con forma apendicular: parapodios en anélidos; lobopodios en onicóforos; ámpulas en ascidias; pies ambulacrales en equinodermos; patas, cuernos, antenas y alas en los insectos; y extremidades en vertebrados (Panganiban y col., 1997; revisado por Angelini y Kaufman, 2005; Mockzec, 2006).

2.- Los apéndices de *Urbilateria*

En un concepto general, Minelli (2000, 2003) plantea que los apéndices serían equivalentes, más no idénticos, al eje principal del cuerpo. Hace énfasis en la presencia de rasgos sexualmente dismórficos en los mismos, al igual que suceden en el eje principal del cuerpo. Así los apéndices corresponderían a

yemas carentes de endoderma. Su idea es extensible tanto a vertebrados como invertebrados. Cita como ejemplos los tarsos anteriores alargados en los machos de ciertas especies de escarabajos o el cayo presente en el pulgar de los machos en algunas especies de sapos.

La existencia de apéndices tanto en vertebrados como en artrópodos es compatible con diferentes escenarios evolutivos. Los indicados por Tabin y col. (1999) se resumen a modo general a continuación: (1) tanto artrópodos como vertebrados descienden de un organismo basal con simetría bilateral (*Urbilateria*), el cual poseía apéndices que se formaban con la misma batería genética que los apéndices en los organismos actuales, (2) *Urbilateria* poseería algún tipo de apéndices, los cuales no sería homólogos a los de los organismos actuales, sin embargo se habría co-optado el mismo mecanismo de formación y (3) los genes implicados en el desarrollo de extremidades habrían sido reclutados de manera independiente en ambos organismos. Sin importar lo que efectivamente haya ocurrido, mientras no se tenga evidencia independiente (por ejemplo, registro fósil) no se podrá responder a si las extremidades de artrópodos y vertebrados corresponden a convergencias u homologías.

A continuación, se discutirán de manera general los apéndices presentes en estos dos phyla. Exponiéndose las diferentes hipótesis sobre sus orígenes y describiendo el proceso de desarrollo de la pata de *Drosophila* y la aleta pectoral del pez cebra.

3.- Apéndices de artrópodos

Uno de los rasgos que caracterizan a los artrópodos es la presencia de patas articuladas. De hecho, etimológicamente “artrópodo” significa “pata articulada”. Pero, la presencia de apéndices en los distintos segmentos corporales es una característica que también se observa en los poliquetos, los cuales poseen parapodios asociados a cada metámero. Sin embargo, la homología entre ambas estructuras es algo incierto aún (Ruppert y Barnes, 1996).

Una característica que permite dividir a los artrópodos corresponde a la presencia o ausencia de dos ramas (exopodito y endopodito) en cada apéndice. Los cangrejos cacerola (Xifosúridos), crustáceos y los extintos trilobites las tienen. En cambio, los ciempiés (Quilópodos), milpiés (Diplópodos) e insectos tienen solo una rama. No se tiene claro cuál es la condición basal (Ruppert y Barnes, 1996).

En insectos existe una gran diversidad de estructuras apendiculares. Ellas pueden incluir apéndices bucales (maxilas y mandíbulas), cuernos, apéndices dorsales (alas, aléteros, élitros y derivados alares), apéndices ventrales (patas) (revisado por Angelini y Kaufman, 2005; Mockzecz, 2006). Es posible reconocer que ciertos genes mantienen dominios de expresión similares en las diferentes estructuras. Por ejemplo, en las regiones proximales de la antena, pata, palpo maxilar y labio (probócide) de *Drosophila* (Díptero) al igual que en el labio de *Oncopeltus* (Hemíptero), se ha demostrado la presencia de *homothorax* (*hth*), mientras que *dll* se expresa en las regiones más distales. Además, en el caso de la antena y pata de *Drosophila*, al igual que el labio de *Oncopeltus* hay un dominio de expresión de *dachshund* (*dac*) en la zona medial (revisado por Angelini y Kaufman, 2005).

Incluso en representantes de los diversos clados (Chelicerata: *Cupiennius*, Myriapoda: *Glomeris*, Crustacea: *Porcellio*, Insecta: *Schistocerca*, *Oncopeltus*, *Drosophila*) presentes en el phylum artrópodo se ha evidenciado una alta, pero no absoluta, conservación en los territorios de expresión de diversos genes (*dll*, *dac*, *extradenticle* (*exd*), *hth*, *dpp*) (revisado por Angelini y Kaufman, 2005). Todo esto evidencia que parte del programa implicado en el desarrollo de apéndices en artrópodos se encuentra conservado entre especies e incluso asociado a distintas estructuras dentro de un mismo organismo.

3.1.-Constitución ancestral de los apéndices en insectos

Snodgrass en su libro *Principles of Insect Morphogenesis* (1935) plantea que el estado basal (*ground state*) de las extremidades en insectos correspondería a “una protrusión, sin segmentación, de la pared del cuerpo con forma lobular o tubular que serviría como apoyo a la locomoción”. En este apéndice ancestral se podría reconocer dos regiones: coxopodito, la cual corresponde a la base y se encontraría adosado a la pared del cuerpo; y telopodito, que corresponde al apéndice en si (revisado por González-Crespo y Morata, 1996). Esta visión se ha reforzado por el análisis de fósiles de *Diaphanopteroidea* correspondientes al Pérmico inferior. Ellos pertenecen al orden más basal de pterigotos, poseían apéndices libres abdominales con segmentos desde el prefémur hasta los tarsos, mientras que los segmentos más proximales estaban incluidos en el tronco ventral (revisado por Kukalová-Peck, 1991).

El “estado basal del apéndice” es aquel que se desarrolla en ausencia de genes selectores. Los genes selectores, en tanto, son aquellos que codifican para factores de transcripción que, en

combinaciones, definen el plan corporal controlando el desarrollo de regiones específicas del embrión (Herke y col., 2005).

Se cree que los apéndices primitivos se desarrollarían sin el efecto de *antennapedia* (*antp*), *hth* o *exd*. Posteriormente, *hth* se comenzaría a expresar en los apéndices más anteriores de manera que los transformaría en antenas. En tanto, en los apéndices torácicos los cuales adquiererían secundariamente la expresión de *antp* se mantendrían con morfología de pata (que sería similar a la del estado basal), ya que este gen reprime el efecto de *hth* (Casares y Mann, 1998) (Fig. 2b). Además, la parte distal de la antena se transforma en pata ante la ausencia de la actividad de *spineless* (*ss*) (Duncan y col., 1998) (Fig. 2a). Congruentemente, hay una transformación de antena-a-pata cuando la función de *exd* u *hth* es removida (Dong y col., 2000). De hecho, en la mutación llamada *antennapedia* donde tiene lugar una transformación homeótica de las antenas en patas, sucede por a una expresión ectópica de *antp* (revisado por Casares y Mann, 2001). Un efecto similar se ve con *sex combs reduced* (*scr*), de hecho la pérdida de función en la pata de *antp* o *antp* y *scr* genera la transformación de una pata en antena (Struhl, 1981).

Utilizando esta evidencia, se ha propuesto un modelo para explicar la diferenciación de los segmentos de la pata. La extremidad ancestral sería similar al apéndice de cuatro segmentos en que se transforma la antena cuando se bloquea la función de *ss*. La actividad de *antp* especificaría la definición de los dos segmentos más proximales: coxa y trocánter. Además, dirigiría al tercer segmento a expandirse y posteriormente formar el fémur, la tibia y el primer segmento tarsal. Finalmente, *ss* dirigiría la diferenciación de los segmentos tarsales. No obstante, esto ocurriría posterior al rol que *ss* adquiere en la especificación antenal. Este modelo se basa en el hecho de que las antenas se especifican muy temprano en la evolución de los artrópodos (Duncan y col., 1998) (Fig. 2a).

No obstante, también hay evidencia en la dirección opuesta. Existen apéndices que se transforman en una estructura similar a una antena cuando ciertos genes son bloqueados. Igualmente, se ha argumentado a favor de la antena como apéndice ancestral en base al hecho de que su morfología pareciera ser mucho más simple de que la una pata (revisado por Minelli, 2003).

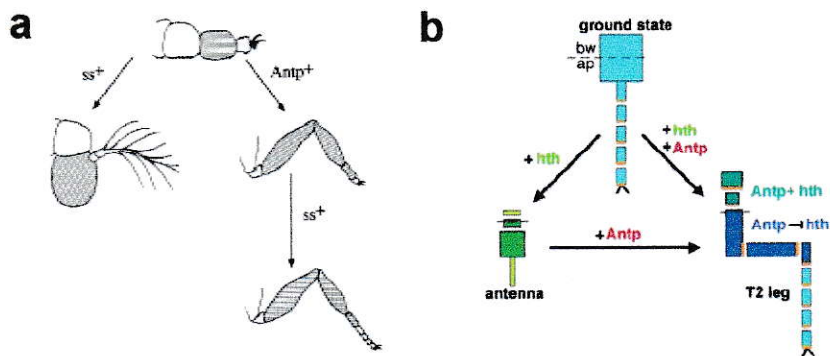


Figura 2: Modelo propuesto para la consitución ancestral de los apéndices de insecto. (a) La forma ancestral del apéndice (*ground state appendage*) sería similar a la morfología adoptada por la antena cuando ésta pierde la función de *sipneless* (*ss*). Esta morfología recuerda a una pata, pero con menos segmentos. Se postula que posteriormente *antenaapedia* (*antp*) influiría en el desarrollo de esta estructura estimulando la diferenciación de los segmentos proximales. Por su parte, *ss* se relacionaría con la diferenciación de los segmentos distales (Duncan y col., 1998). (b) También se incluye el rol de *hth* como un selector homeótico de antena, el cual es inhibido por *antp* en los segmentos proximales de la pata (Casares y Mann, 2001). bw: body wall; ap: appendage.

3.2.- Desarrollo de la pata de *Drosophila*

El desarrollo de la extremidad de *Drosophila* sucede a través de una estructura llamada disco imaginal. El correspondiente a la pata consiste en un primordio con forma de paleta, el cual se desarrolla durante los estadios larvales y posteriormente en la pupa entra en una fase de protrusión y diferenciación. En particular, el disco imaginal correspondiente a la pata se inicia con 30 células embrionarias que luego de proliferar alcanzan cerca de 15.000. La distribución de los ejes D/V y A/P en el disco y en la pata adulta son equivalentes. Sin embargo, respecto al eje proximal/distal (P/D) hay una distinción. Dado que el disco es una estructura plana que luego protruye, en un proceso llamado telescopaje, aquello que en el disco es central en la pata será distal, en tanto lo que es periférico pasará a ser proximal (revisado por Couso y Bishop, 1998) (Fig. 3).

Se han reportado una serie de genes implicados en el establecimiento de sus ejes A/P, D/V, P/D, junto con la diferenciación de sus segmentos (podómeros). La mayoría de estos genes se encuentran implicados en alguna vía de señalización: vía de Hh/Shh, vía de Bmp/Dpp, vía de Wg/Wnt, etc.

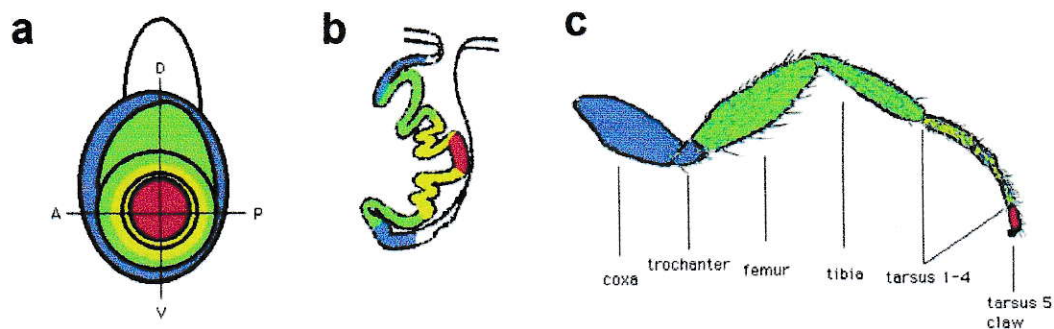


Figura 3: Disco imaginal y pata adulta de *Drosophila*. Se presentan distintos estadios de desarrollo. El código de colores corresponde a la identidad de los segmentos en los distintos esquemas. (a) Disco imaginal. A: anterior; P: posterior; D: dorsal; V: ventral (b) Vista lateral del disco imaginal justo antes del proceso de telescopaje. (c) Pata del adulto y sus respectivos segmentos (modificado de Couso y Bishop, 1998).

4.- Apéndices de vertebrados

La presencia de extremidades corresponde a un rasgo ampliamente representado en los vertebrados. Su primera aparición es debatida. Se ha planteado que ya existen en vertebrados basales como *Haykouchthys* y *Milloukunmingia*. Pero, esto ha sido discutido, debido a la falta de evidencia de un soporte esquelético y muscular. Esta característica sería distintiva de las extremidades respecto a otras protrusiones laterales, las cuales se originan varias veces en la filogenia de los vertebrados (Coates, 2003). Entre ellas se pueden mencionar, las aletas caudales y dorsales en algunos cetáceos, frondas pareadas en los dragones marinos (*Phyllopterox*), aleta dorsal en ictiosaurios, las quillas caudales en los tiburones mackerel y las quillas laterales en los atunes.

Las primeras protrusiones similares a una aleta pectoral que se conocen se encuentran en telodontos agnatos. Sin embargo, no es evidente que ellas posean un soporte endoesquelético (Coates y Cohn, 1998). Mientras que las primeras aletas pectorales con un esqueleto interno surgen tardíamente en los ostracodermos (Janvier, 1996a, b). En su versión más generalizada, el esqueleto apendicular consta de dos pares de extremidades asociadas a sus correspondientes cinturas. Las estructuras que los componen varían de acuerdo al grupo estudiado. Desde una aleta a un brazo existe una inmensa diversidad de estructuras óseas, dérmicas y musculares (Fig. 4a, b).

Lo que unifica esta enorme diversidad corresponde al desarrollo temprano de estas estructuras. Una buena generalización podría caracterizar a la yema de la extremidad como una unidad estructural que

consta de tejido ectodérmico y mesodérmico. El primero corresponde al *apical ectodermal ridge* (AER), el cual es un epitelio que recubre a la yema. Bajo éste se encuentra tejido mesodermal mesenquimático. Entre ambas regiones se dan relaciones inductivas que desencadenan procesos de proliferación, polarización y diferenciación. En estos procesos, se han encontrado la participación de la vía de Sonic hedgehog, Bmp, Wnt y proteínas Fgf (revisado por Niswander, 2003).

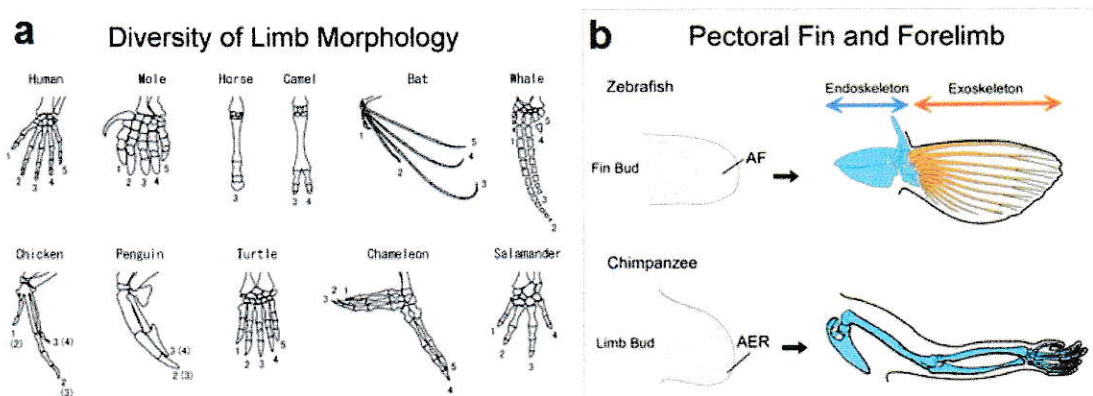


Figura 4: Diversidad de extremidades en vertebrados. (a) Esquema que muestra los esqueletos de los autópodos presentes en diversos tetrápodos. (b) Esquema que muestra comparativamente la extremidad anterior de un pez y un chimpancé. Notar que en el pez existe presencia de exoesqueleto, el cual deriva del pliegue apical (AF). (modificado de la página web del Laboratorio del Profesor Koji Tamura <http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/english/index.html>).

4.1.- Hipótesis sobre el origen de las extremidades en vertebrados

+ *Hipótesis del Arco Branquial*

A mediados del S. XIX, C. Gegenbaur plantea que las extremidades serían derivadas de los arcos branquiales. Esto lo hace por observaciones realizadas en las aletas de condricios, las cuales consideró las menos divergentes del plan original. Posteriormente refuerza sus observaciones en base a las aletas metapterigiales encontradas en el dipnoo australiano *Neoceratodus*. Estas aletas poseen una cadena de piezas endoesqueléticas que forman en eje metapterigial. Hacia las zonas anterior y posterior se dirigen radiales endoesqueléticos de soporte (revisado por Kardong, 1999). Gegenbaur propone que el eje metapterigial correspondería a un radio branquial extendido y su arco branquial daría origen a la cintura pectoral. En tanto, los radiales se originarían posteriormente (Fig. 4a).

En 2002, O'Rourke y Tam realizan una extensa revisión de los genes expresados en la extremidad y el arco branquial de ratón. Se encuentra gran cantidad de genes comunes presentes en distintas vías de señalización como son la vía de Shh (*shh*, *gli1*, *gli2*, *gli3* y *ptc*), vía de Wnt (*wnt5a* y *wnt11*), vía de Bmp (*bmp2*, *bmp4* y *bmp7*) y proteínas Fgf (*fgf4*, *fgf8*, *fgf9*, *fgf10* y *fgfr2*). Además, hay una gran cantidad de factores de transcripción comunes. Entre ellos se pueden mencionar: *twist*, *dlx1*, *dlx2*, *dlx3*, *dlx5*, *dlx6*, *msx1*, *msx2*, *alk3*, *alk4*, *cart1*, *pitx1*, *gsc* y *mtsh* (para más detalles revisar O'Rourke y Tam, 2002).

Recientemente, Gillis y col. (2009) han realizado en raya, *Leucoraja erinaceae*, experimentos funcionales y verificado el patrón de expresión de genes típicos de extremidad. Encuentran que la aplicación exógena de ácido retinóico (RA) genera duplicaciones especulares del esqueleto del arco branquial. Consistentemente, la duplicación sucede en la zona dorsal que es donde se encuentra la expresión inducida de Shh. Algo equivalente, se ha reportado previamente en las extremidades.

+ Hipótesis del Pliegue-Aleta

Mientras Gegenbaur desarrolla sus ideas, F.M. Balfour y J.K. Thacher plantean independientemente la Hipótesis del Pliegue-Aleta. Ella postula que los vertebrados basales poseerían una aleta continua tipo cinta y la subdivisión de ella daría origen a las extremidades (Fig. 5b). Existe una serie de evidencias indirectas que avalan esta hipótesis. Entre ellas podemos mencionar la presencia de un pliegue ventro-lateral en *Myllokuningia* y *Haikouichthys* (Shu y col., 1999), sin embargo, como se dijo previamente, esto no está exento de debate. La otra evidencia que se ha presentado es la presencia de espinas pariadas entre las aletas pectorales y pélvicas en ciertos acantodios como *Euthacanthus*. Sin embargo, más que ser considerado un remanente de una aleta continua, esto se ha evaluado como una especialización de este grupo (Coates, 2003). Por otro lado, se ha reportado la presencia de pliegues metapleurales en los costados del cuerpo de amphioxus (*Branchiostoma floridae*) (Ruppert y Barnes, 1996). Ello sería muy sugerente en caso de que representara una condición ancestral, dado que los cefalocordados corresponden a un subphylum basal al de los vertebrados.

Además, se han encontrado gran cantidad de similitudes de expresión génica entre la aleta medial larval y las aletas pareadas del pez cebra. En *Danio rerio*, se ha visto que esta aleta crece a partir de las 16

horas post fecundación (hpf) desde la zona caudal hacia anterior. Su crecimiento se ve acompañado de la expresión de genes como *dlx5a* y *sp9*. En las aletas pectorales existen representantes de ambas familias de genes (Abe y col., 2007). Además, posteriormente a las 30 hpf se puede encontrar expresión de *msxA*, *msxB*, *msxC* y *msxD* en toda la aleta medial. Todos los *msx* mencionados, excepto *msxC*, se expresan tanto en la porción ectodermal como mesodermal de la aleta medial como en la aleta pectoral. *msxC* lo hace solo en tejido mesodermal (Akimenko y col., 1995a).

Otro descubrimiento actual que apoya la hipótesis del Pliegue-Aleta es la existencia de bandas de competencia de inducción de AER. Ellas corresponden a territorios que frente a ciertos estímulos, por ejemplo presencia de *fgf7* o *fgf10*, generan AER ectópicos. En el pollo se han reportado tres bandas. Una de ellas en la línea media dorsal del cuerpo desde el cuello a la cola, mientras que las otras dos en los flancos entre las extremidades anteriores y posteriores (Tamura y col., 2001) (Fig. 5c).

Aparte de las dos hipótesis propuestas, durante la última década se han presentado nuevas ideas sobre el origen de las extremidades. Una de ellas correlaciona los patrones de expresión de genes Hox en el eje del cuerpo con la aparición de las extremidades (Coates y Cohn, 1998).

4.2.- Desarrollo de la aleta del pez cebra

El desarrollo temprano de la aleta pectoral del pez cebra resulta en varios aspectos similar al descrito para otros vertebrados. Básicamente, la extremidad inicia su desarrollo como una yema de tejido mesenquimático rodeado de una capa de tejido epitelial. Para el desarrollo de la misma, también resultan importantes distintas moléculas secretadas desde el mesoderma somítico, placa lateral del mesodermo y mesoderma intermedio. A nivel molecular se han descrito similitudes como la activación de *fgf8* mediada por *wnt3a*, este mecanismo se ha encontrado en tetrápodos y peces (revisado por Mercader, 2007). Sin embargo, llegado un momento del desarrollo de la aleta, el mesénquima deja de proliferar y lo hace solo la capa ectodermal. Esto es lo que se conoce como la fase de pliegue ectodermal, ella diferencia el desarrollo de la extremidad de tetrápodo y la de actinopterio (revisado por Sordino y Duboule, 1996; revisado por Mercader, 2007).

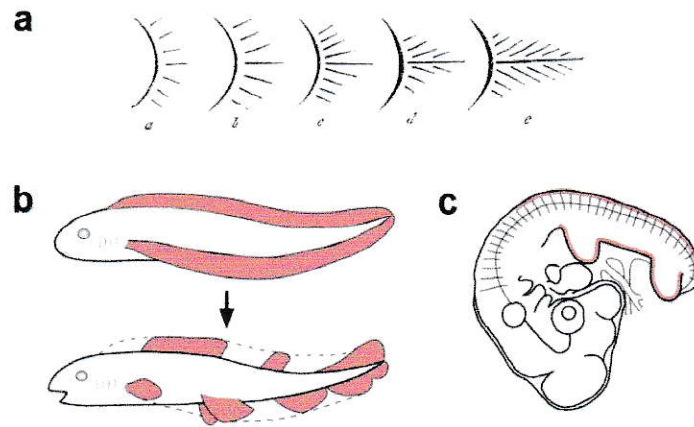


Figura 5: Esquemas de las hipótesis del origen de las extremidades en vertebrados. (a) Dibujo de Gegenbaur que ilustra la posible transformación de un arco branquial en una extremidad. El arco mismo correspondería a la cintura escapular, mientras que uno de los radios branquiales se habría convertido en el eje metapterigial de la extremidad. (b) Esquema que ilustra la hipótesis del Pliegue-aleta (Tamura y col., 2001). (c) Esquema de embrión de pollo que muestra en rojo las regiones en las que es posible la inducción de AER ectópicos (Tamura y col., 2001).

Luego de eclosionar, las aletas pectorales continúan creciendo y manteniendo su estructura larval por las primeras dos semanas de vida. Posteriormente, tienen lugar procesos de osificación, migración y división celular, los que finalmente establecen la aleta adulta (Grandel y Schulte-Merker, 1998) (Fig. 6).

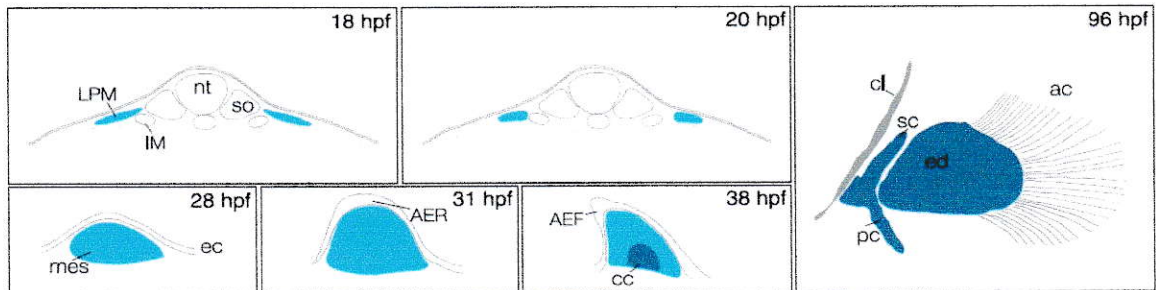


Figura 6: Desarrollo de la aleta pectoral de pez cebra. Esquemas que muestran en una sucesión temporal (18 hpf hasta 96 hpf) las estructuras implicadas en el desarrollo de la aleta pectoral. Los esquemas de las 18 hpf y 20 hpf corresponden a cortes transversales del embrión completo. Las imágenes de 28 hpf, 31 hpf y 38 hpf corresponden a acercamientos del primordio de aleta. Arriba es distal y abajo es proximal. Finalmente, el esquema de las 96 hpf corresponde al estadio más tardío mostrado. Izquierda es proximal y derecha es distal. ac: actinotrichos; AEF: plegamiento ectodermal apical (*apical ectodermal fold*); AER: *apical ectodermal ridge*; cc: condensación de cartílago; cl: cleitro; ec: ectoderma; ed: disco endocondral; IM: mesodermo intermedio; LPM: placa lateral del mesodermo; mes: mesénquima; nt: tubo neural; pc: proceso postcoracoide; sc: proceso escapulocoracoide; SO: somitos (modificado de Mercader, 2007).

Pese a ser similares en varios aspectos, existen diversas diferencias con el desarrollo de extremidades de tetrápodos. En primer lugar, se puede mencionar una diferencia histológica en el AER. En los peces, existe un estrato basal ausente en pollos. No obstante, la misma estructura se ha encontrado en otros tetrápodos como tortugas y lagartos (Grandel y Schulte-Merker, 1998). Referente a la geometría e interacciones génicas que suceden en este contexto, en tetrápodos se establece una retroalimentación positiva recíproca entre el epitelio ectodermal y la zona de actividad polarizante (ZPA). Ella favorece la proliferación del tejido mesenquimático. Particularmente, sucede una sobreproliferación en la región posterior, la cual finalmente constituirá el autopodio. En peces, en cambio, la retroalimentación es interrumpida mecánicamente por la aparición de los actinotrichos. Así en teleósteos, la proliferación del mesénquima es reducida, en cambio existe un proceso de plegamiento de la capa ectodermal. En ella es donde se originan los radios que corresponden a osificaciones dermales. Éstos se encuentran ausentes en tetrápodos, de hecho no existe un proceso de plegamiento de la capa ectodermal (revisado por Sordino y Duboule, 1996) (Fig. 4b). A nivel de interacción génica también existen diferencias: (i) en pez cebrá no se requiere de Fgfs para activar expresión de *tbx5* y (ii) no se han encontrado ortólogos de *fgf24* en tetrápodos (revisado por Mercader, 2007).

5.- Herramientas bioinformáticas de investigación

"We have entered the post genomic era. The human genome has been sequenced as have a number of other organisms. We are now confronted with the problem of understanding the behavior of simple and complex genetic regulatory networks."

- Trent Toulouse, Ping Ao, Ilya Shmulevich y Stuart Kauffman (2005)

Desde 1995, cuando se conocían solamente 2 genomas bacterianos, la sistematización de los procesos de secuenciación de genomas junto con la generación de bases de datos masivas han puesto a disposición de la comunidad científica una enorme cantidad de datos. Según información publicada en Genomes OnLine Database v2.0 -GOLD- (Liolios y col., 2007) para enero de 2009, existían 916 genomas completamente secuenciados y 3454 proyectos incompletos. La mayor parte de los proyectos de secuenciación correspondían a genomas bacterianos (2968) y en un segundo lugar se encuentran los proyectos con eucariontes (1111). Datos de enero de 2008, muestran que la mayoría de los proyectos en

eucariontes corresponden a hongos (309). Mientras que entre los animales, los artrópodos (83) y los vertebrados (144) son los mayormente representados. Además, en varios casos se tiene información de los proteomas completos de los organismos.

Todos estos datos pueden ser utilizados para encontrar, por ejemplo, proteínas ortólogas entre distintas especies. Para ellos se utiliza un algoritmo llamado Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul y col., 1990). Éste corresponde a una de las herramientas de uso más tradicionales en la bioinformática. Se puede encontrar en sitios web como del National Center for Biotechnology Information (NCBI) o European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Además, a partir de las secuencias proteicas se puede predecir una gran cantidad de información como la ubicación subcelular, punto isoelectrico, carga, sitios de fosforilación, etc. Muchos de estos programas se pueden encontrar en el sitio web de Expert Protein Analysis System (ExpASY).

Complementariamente, existen proyectos que trabajan en la anotación de los genomas. Vale decir, en base a algoritmos bioinformáticos y curación manual, realizar una “ficha” a cada gen presente en el genoma. Existen varios *browsers* que pueden ser utilizados para explorar esta información. Entre los principales se puede mencionar NCBI Genome, UCSC Genome Bioinformatics y Ensembl Genome Browser. El número de genomas anotados es enormemente menor que el de los secuenciados. Sin embargo, incluye una amplia variedad de organismos que se encuentran en diversos puntos de la filogenia. Entre los animales se puede mencionar a: *Caenorhabditis elegans*, mosca (*Drosophila melanogaster*), mosquito (*Anopheles gambiae*), *Ciona intestinalis*, pez cebra (*Danio rerio*), *stickleback* (*Gasterosteus aculeatus*), *Xenopus tropicalis*, lagarto anolis (*Anolis carolinensis*), ave diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*), ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*), *opossum* (*Monodelphis domestica*), murciélago (*Myotis lucifugus*), chimpancé (*Pan troglodytes*), humano (*Homo sapiens*), delfín (*Tursiops truncatus*), alpaca (*Vicugna pacos*), entre otros. Esto permite un nivel de comparación más detallado que solamente alinear secuencias sin conocer mayor información de ellas.

Además, la gran cantidad de datos obtenidos a partir de patrones de expresión génica de varios organismos modelo se ha sistematizado y existen en sitios web en los que se ha agrupado de manera muy detallada información asociada al rol en el desarrollo de distintos genes (anotación de genomas, ortologías,

fenotipos de mutantes, etc). Entre los organismos para los que se ha efectuado esta recopilación se puede mencionar: *Nematostella vectensis* (StellaBase y Nematostella.org), *C. elegans* (WormBase), *Heliconius* (Heliconius Homepage), *D. melanogaster* (FlyBase), *D. rerio* (Zebrafish Information Network -ZFIN-), *Mus musculus* (Mouse Genome Informatics -MGI-), entre otros.

Además, como apoyo a la información presente en estas bases de datos, se pueden encontrar programas que buscan información en literatura primaria. Hay gran variedad de opciones para realizar búsquedas. Por ejemplo, la co-ocurrencia de términos (“text mining”) o la presencia de los mismos dentro de un determinado contexto. Dos sitios web muy útiles en este aspecto corresponden a: Information hyperlinked over Proteins (iHOP) y Functional Protein Association Networks (STRING).

Por otro lado, con bases de dato obtenidas a partir de experimentos de doble híbrido, experimentos bioquímicos o bien experimentos de interacción génica se han generado distintos tipos de redes. Una red génica es un grupo de procesos interconectados que gobiernan la forma en la que diferentes genes en una célula se expresan en el tiempo y espacio (revisado por Potatov, 2008). Estas representaciones han sido estudiadas como sistemas complejos. Así se han aplicado en ellas gran parte de los avances propios de la teoría de grafos. De esta manera se han logrado encontrar regularidades en las redes de interacción y caracterizar las mismas a través de distintos parámetros (revisado por Junker, 2008). También, se han realizados modelos matemáticos de su funcionamiento. Usualmente, para esto último se han utilizado las redes booleanas (Kauffman, 2008). La información que puede obtenerse de este tipo de simulaciones se relaciona con la generación de un modelo de variables controladas en el que de manera teórica se pueden alterar sus componentes y observar su efecto en una dinámica global. Esto puede utilizarse como una primera aproximación o incluso una hipótesis de trabajo experimental. Dicho de otro modo, la simulación de redes tiene un rol predictivo. Por otro lado, en los casos que no es posible obtener suficiente información como para construir una simulación, la simple visualización en forma de red permite analizar el proceso del desarrollo a una escala más global que los genes particulares (Stathopolulos y Levine, 2005). Combinando gran parte de estos avances se han creado bases de datos en las que se predicen rutas metabólicas en distintos organismos secuenciados, un ejemplo de esto es la

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes -KEGG- (Kanehisa y Goto, 2000). Complementariamente, también existe un portal de WikiPathways.

Todas estas herramientas y bases de datos componen una red abierta e interactiva a la cual cualquier usuario puede tener acceso para obtener o en muchos casos agregar información. Esta enorme cantidad de conocimiento asociado a distintos genomas y su expresión durante el desarrollo permiten realizar estudios comparativos entre distintas especies. A través de ellos se pueden explorar parte de los procesos de diversificación que generan los diversos linajes que componen el árbol de la vida.

6.- Hipótesis, Objetivos y Relevancia de la Investigación

Una aproximación natural al estudio de ancestralidad de dos estructuras es buscar qué es lo que se ha dicho sobre el origen de las mismas. Sin embargo, en este caso las hipótesis que se han planteado sobre el origen de las extremidades en vertebrados y artrópodos no tienen relación entre sí. Por ello se hace necesario cambiar la estrategia de búsqueda.

Considerando las herramientas experimentales, bases de datos disponibles y la literatura, es posible realizar una comparación a nivel de la red de interacciones genéticas de ambas estructuras. Si bien, no hay suficiente información para reconstruir completamente ambas redes, es suficiente para poder obtener ideas generales sobre los aspectos comunes y particulares del desarrollo de ambas estructuras. Los primeros, ilustran como podría haber sido una red ancestral a ambos organismos. Esta aproximación ha sido utilizada previamente en la comparación de la especificación temprana del endomesodermo de un erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, y una estrella de mar, *Asterina miniata*. Organismos con una divergencia cercana a los 500 millones de años (Hinman y Davidson, 2007).

La comparación entre las extremidades de vertebrados e insectos se ha hecho previamente (Géraudie, 1995; Shubin y col., 1997; Tabin y col., 1999; Capdevilla y col., 2000; Minelli, 2003; Pueyo y Couso, 2005; Iovine, 2007), sin embargo, salvo el último trabajo citado siempre se ha considerado como vertebrado modelo a un tetrápodo. Asimismo, la aproximación que típicamente (excepto en Pueyo y Couso, 2005) se ha utilizado, es comparar gen por gen y no la red de interacciones. En base a los trabajos

recién citados y en consideración de la disponibilidad de información mencionada en la introducción, se trabajará con la siguiente hipótesis y buscaránr los objetivos mencionados a continuación.

Hipótesis:

“Existe conservación en la red de interacciones génicas, implicadas en el desarrollo temprano, asociada a los procesos que definen la formación de patrones (dorso/ventral, anterior/posterior y próximo/distal) en los apéndices de artrópodos (*Drosophila melanogaster*) y vertebrados (*Danio rerio*).”

Objetivos:

OBJETIVO GENERAL: Reconstruir una red génica común a artrópodos (*D. melanogaster*) y vertebrados (*D. rerio*) asociada a la formación de patrones (dorso/ventral, anterior/posterior y/o próximo/distal) en apéndices locomotores (pata y aleta).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Establecer, en base a revisión bibliográfica, los genes conservados en el desarrollo de pata y aleta.
- 2.- Construir y comparar los grafos de interacción génica correspondientes al desarrollo de extremidades de *D. melanogaster* y *D. rerio*. A partir de ellos, mediante métodos bioinformáticos buscar la presencia de posibles genes conservados en ambas especies.
- 3.- Comprobar expresión en apéndices de posibles genes conservados, los cuales de preferencia han de estar cercanamente conectados en la red, vale decir que interactúen, directa o indirectamente.
- 4.- Encontrar evidencia (funcional o expresión de proteína) de la actividad en la aleta pectoral de algún gen conservado.

La relevancia de este trabajo radica en el hecho de utilizar una aproximación sistémica a la comparación del desarrollo de una estructura. Ello permite sintetizar gran cantidad de información a fin de poder evaluarla a modo general. Por otra parte, la comparación misma servirá como base para el planteamiento de experimentos. El vertebrado que se utilizará como modelo será un pez. En la mayoría de los trabajos encontrados, en los que se ha realizado una comparación similar se ha utilizado como modelo a los tetrápodos. El observar otros vertebrados permite validar aún más la conservación del mecanismo y

evidenciar sus posibles variaciones. Notar que la divergencia actinopterigios/sarcopterigios data de aproximadamente 450 millones de años (Ruvinsky y col., 2000). Además, morfológicamente una aleta y un brazo presentan grandes diferencias, sobre todo en las regiones más distales (Fig. 4b).

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Trabajo Teórico/Bioinformático

1.1.- Modelos de estudio

Como modelo de artrópodos se eligió a la mosca, *Drosophila melanogaster*. Ella es, por lejos, uno de los animales mayormente estudiados en lo que respecta a genómica, genética y biología del desarrollo. Entre todos sus apéndices se eligió estudiar la pata. Esto por varias razones. La primera de ellas es que corresponde a una estructura presente en todos los grupos de insectos a diferencia de las alas. Además, en base a estudios sobre el origen de los apéndices en artrópodos, se ha postulado que esta correspondería a una estructura similar al estado basal o *ground state* (Duncan y col., 1998).

De acuerdo con los intereses de la tesis, se eligió un pez como modelo vertebrado. Si bien, cuatro son las especies de peces más estudiadas en biología del desarrollo solamente el pez cebra, *Danio rerio*, posee una enorme cantidad de trabajos y herramientas moleculares estandarizadas para su investigación. Por esta razón fue elegido como modelo. Como apéndice locomotor se observará la aleta pectoral.

1.2.- Construcción de las redes

+ Búsqueda de información

Las redes de interacción genética se construyeron sobre la base de información obtenida de la literatura. Como punto de partida se utilizaron las revisiones más actualizadas de la información asociada al desarrollo de la pata en *Drosophila* (Couso y Bishop, 1998; Kojima, 2004) y la aleta pectoral en pez cebra (Mercader, 2007). A partir de los genes encontrados en ellas se buscó información de los mismos en PubMed. Para ello se utilizaron como palabras claves: “nombre del gen” – “zebrafish/drosophila” – “pectoral fin/leg”.

Este método de búsqueda generó progresivamente nuevos genes a buscar, para los cuales se repitió el mismo procedimiento. Una vez realizado esto se procedió a buscar información sin sesgo, vale decir en el buscador de PubMed se colocaron las palabras: “zebrafish/drosophila” – “pectoral fin/leg”.

De los trabajos encontrados por la búsqueda en PubMed se descargaban solo aquellos que por su título y resumen parecían relevantes. Como criterios de relevancia se utilizó: (1) implicancia de los genes estudiados en procesos de establecimiento de patrones y/o formación del primordio/disco imaginal de extremidad, (2) presencia de patrones de expresión, (3) presencia de descripción de interacciones genéticas. No se consideró como relevante: (1) el año de la publicación o (2) la revista. En total se descargaron un poco menos de 500 escritos. Los trabajos fueron revisados desde los más actuales hasta los más antiguos. Ello permitió que fuesen evaluados rápidamente aquellos publicados hace más tiempo. Se dio prioridad a la información descrita en introducciones y discusiones.

Además, se utilizaron dos fuentes de información complementaria. En el caso de *Drosophila* se revisaron las descripciones de desarrollo de disco imaginal de pata presentes en el sitio web Interactive Fly (<http://www.sdbonline.org/fly/aimorph/leg.htm>). Para el pez cebra, se buscaron patrones de expresión descritos en el sitio web Zebrafish Information Network -ZFIN-.

Los estadios en los que se puso énfasis al buscar la información fueron aquellos en los que se da, en términos generales, el crecimiento y la diferenciación de las regiones de la extremidad. En el caso de *Drosophila*, se consideró desde larva 2 intermedia hasta larva 3 tardía, mientras que en el pez cebra, desde las 22 hpf hasta las 96 hpf.

+ *Procesamiento de la Información*

La información que se buscó se relacionaba con genes asociados al desarrollo de cada extremidad. Poniendo especial énfasis en aquellos implicados en procesos de establecimiento de patrones y/o formación del primordio/disco imaginal de extremidad. Las preguntas con las que se buscó caracterizar cada gen fueron: (1) ¿Dónde se expresa?, (2) ¿Cuándo se expresa?, (3) ¿Con que otros genes establece interacciones y de qué tipo son? Además, toda la información asociada a pérdidas o ganancias de función o el rol de este gen en otros organismos.

La mejor manera de sintetizar toda la información recopilada fue a través de la construcción de una red de interacciones. Para esto se utilizó el programa BioTapestry (<http://www.biotapestry.org/>) (Longabaugh y cols., 2005). Él permite la construcción, visualización y simulación de redes regulatorias génicas. Por otro lado, es un software libre y tiene una licencia de fuente abierta.

BioTapestry permite ingresar información de interacción binaria entre distintos elementos. En el caso particular de las redes construidas estos elementos corresponden principalmente a genes, sin embargo también se han incluido algunas otras moléculas relevantes (Proteoglicanos de heparan sulfatos, HSPG, o ácido retinóico, RA). Sin embargo, por simplicidad de aquí en adelante se hablará de manera general de “genes” al referirse a los componentes de la red y cuando sea necesario se hará explícita la salvedad. Otra facilidad del programa es que permite distinguir distintas regiones en las que sucede la expresión génica junto con realizar una animación que muestre la dinámica temporal en la que se van expresando los genes y tienen lugar las interacciones. Además, posee opciones de búsqueda que permiten encontrar rápidamente un determinado gen, sus genes objetivos o los genes que tienen efecto sobre él. Por otro lado, está diseñado para que la información pueda ser modificada con total facilidad. Esto es muy beneficioso al momento de generar una red asociada a un fenómeno que aún se está estudiando, por lo que muchas cosas pueden cambiar, agregarse o eliminarse.

+ Organización de la información

Para la construcción de las redes se utilizaron ciertos criterios generales que serán descritos a continuación:

- a) Solo se incluyeron en la red genes que tengan interacciones con otros genes.
- b) Solo se consideraron aquellas interacciones que estén bien documentadas y hayan sido descritas/discutidas por los autores de algún trabajo. En ningún caso se supuso o concluyó la existencia de una interacción sobre la base de reevaluación de la evidencia encontrada en los trabajos revisados.
- c) Las interacciones se clasificaron en “inhibiciones” o “activaciones”.
- d) Las interacciones son directas sobre cada gen, vale decir no se agruparon en procesos. Por ejemplo, si cinco proteínas están implicadas en la formación de un complejo de proteólisis que

lleva al clivaje de otra proteína y con ello su inactivación, en la red se señala que las cinco proteínas estén inhibiendo a aquella que sufre la proteólisis (Fig. 7a).

- e) Cuando se encontró información contradictoria o incompleta se privilegió aquello que haya sido publicado más recientemente. Por ejemplo, si en 1992 se describió que el gen X activa al gen Y; y luego en 2006 se describe que el gen X inhibe al gen Z que es un inhibidor del gen Y. Se incluye en la red aquello descrito en el año 2006 (Fig. 7b).
- f) Cuando un gen tenga expresión en más de una región, se indicó su presencia y sus respectivas interacciones en todas las regiones en las que está descrito. Para efectos de representación, las interacciones siempre se dibujaron con genes que estén en la misma región o bien en la adyacente. Esto se explicará a través de algunos de ejemplos.

Ejemplo 1: Se tienen 2 regiones (R1 y R2). Se sabe que el gen X activa al gen Y; y ambos genes se expresan en ambas regiones. Esta situación se representaría con la activación del X sobre el gen Y tanto en R1 como en R2 (Fig. 7c).

Ejemplo 2: Se tienen 2 regiones (R1 y R2). Se sabe que el gen X activa al gen Y; el gen X se expresa en R1 y R2 mientras que el gen Y lo hace solo en R1. Esta situación se representaría con la activación del X sobre el gen Y solo en R1 (Fig. 7d).

Ejemplo 3: Se tienen 2 regiones (R1 y R2). Se sabe que el gen X activa al gen Y; el gen X se expresa en R1 y el gen Y en R2. Esta situación se representaría con la activación del X (presente en R1) sobre el gen Y (presente en R2) (Fig. 7e).

Además, se tomaron una serie de consideraciones particulares asociadas a la construcción particular de la red de *Drosophila* y el pez cebra. En primer lugar, respecto a la red correspondiente a la pata de *Drosophila*, se incluyeron una serie de genes cuya expresión no se ha reportado explícitamente en el disco imaginal de pata. Sin embargo, por encontrarse involucrados en vías de señalización canónicas resulta muy probable que los mismos se encuentren presentes. El interés principal de incluirlos se relaciona con generar una red lo más completa posible, ya que ella se utilizará posteriormente para planificar experimentos (detalles descritos más adelante). Estos genes están escritos con letras mayúsculas

y sus tiempos y sitios de expresión han sido copiados de aquellos genes con los que interactúan. Esto se hizo para poder incluirlos en la red.

Los genes se asignaron en 16 regiones según su territorio de expresión: Dorsal, Central, Anterior, Posterior, Ventral, Cx (coxa), Tr (trocánter), Fe (fémur), Ti (tibia), Ta1 (tarso 1), Ta2, Ta3, Ta4, Ta5, Ta5/Pr (tarso 5/pretarso) y Pr (pretarso). Las primeras cinco hacen alusión a regiones dentro del disco imaginal, mientras que las otras 11 se refieren a segmentos de la pata adulta. Notar que en el disco imaginal estos segmentos tienen representación de discos concéntricos en los cuales los más centrales tendrán una ubicación distal y los más periféricos una proximal. Para efectos de representación, en las primeras cinco regiones se incluyeron aquellos genes que tienen expresión transversal a todos los segmentos, pero focalizada en una región del disco. En tanto, en las regiones que se corresponden con los segmentos de la pata adulta se destinaron a los genes que tienen expresión en aquellos anillos concéntricos, con expresión en todas (Dorsal, Central, Anterior, Posterior, Ventral) las regiones del disco.

Los tiempos de expresión siguen las descripciones de la literatura. En el caso de que su expresión fuese descrita en la “larva 3” se consideró el período completo. En cambio, si se especificaba en una unidad menor de tiempo esto era lo que se consideraba. Como tiempo de inicio para larva 2 se consideraron las 48 hrs AEL; el comienzo de la larva 3 corresponde con las 72 hrs AEL; la larva 3 intermedia a las 96 hrs AEL; y el final de la larva 3 son las 120 hrs AEL (Couso y Bishop, 1998).

Respecto a la red correspondiente a la aleta pectoral de pez cebra, para asignar los lugares de expresión, los genes se asignaron en 13 regiones denominadas: MS (mesodermo somítico), MI (mesodermo intermedio), PLM (placa lateral del mesodermo), Aleta anterior, Aleta, Aleta posterior, mes. (mesodermo), mes. anterior, mes. posterior, AER (*apical ectodermal ridge*), AER dorsal, AER ventral y AER posterior. Los genes ubicados en la región “aleta” corresponden a aquellos genes cuya expresión es compartida entre la zona mesodermal y ectodermal de la misma, o bien, no está descrito en detalle. Del mismo modo, aquellos genes cuya expresión se encuentre descrita para toda la aleta o todo el mesoderma o todo el AER se ubicarán en las regiones denominadas “aleta”, “mes.” o “AER”, respectivamente. Hay casos en los que se ha documentado polarización de la expresión. Por ello existen algunos ubicados en regiones anteriores, posteriores, dorsales o ventrales de las tres regiones antes mencionadas.

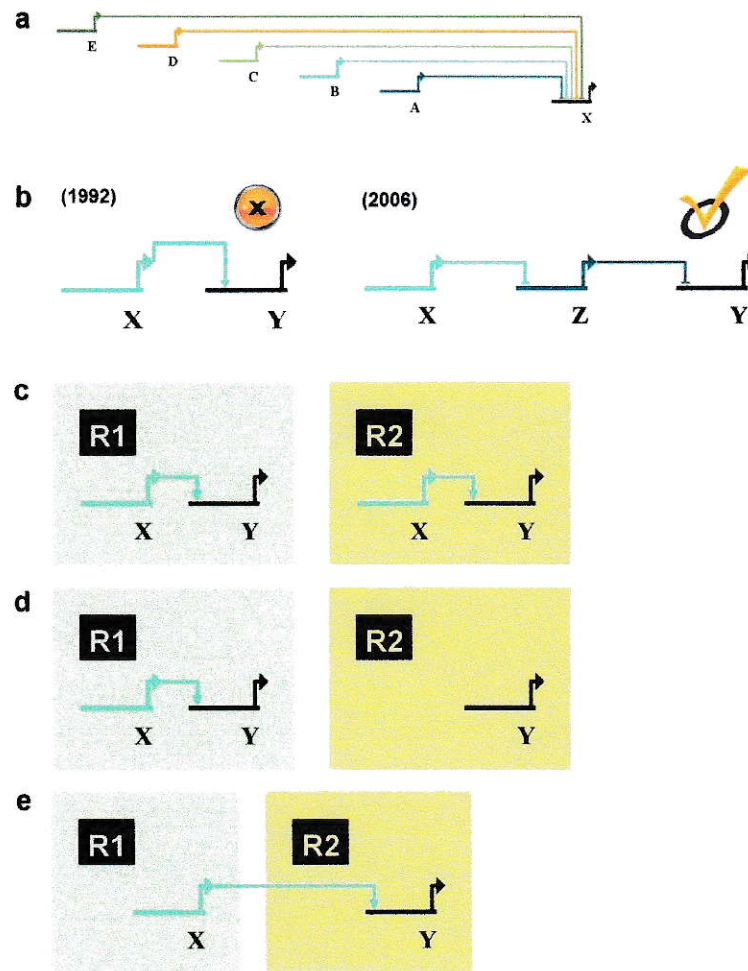


Figura 7: Ilustraciones de las Reglas Básicas utilizadas para construir las redes. Para mayores explicaciones ver el texto.

Los tiempos de expresión corresponden al rango temporal más amplio que puede obtenerse al comparar los registros encontrados entre las *in situs* presentes en diversas publicaciones y los rangos temporales descritos en ZFIN. Por ejemplo, si en una publicación muestran presencia del gen X a las 36 hpf y en ZFIN se señala que su expresión desde el estadio de *High-Pec* (comienza a las 42 hpf) hasta el estadio de *Long-Pec* (comienza a las 42 hpf y termina a las 60 hpf); en la red el gen X aparecerá activo desde las 36 hpf hasta las 60 hpf. No obstante, lo más frecuente es que lo encontrado en las publicaciones se encuentre dentro del rango de lo reportado en ZFIN.

Esta determinación, se basa en el hecho de que en ZFIN los tiempos de expresión están descritos en base a estadíos fijos. De esta manera si se ha reportado la expresión de un gen en algún momento dentro de la ventana temporal de dicho estadío se reportará como si se expresara en todo ese tiempo. Algo similar ocurre con la forma de describir los tiempos de expresión en *Drosophila*.

Al efectuar la animación de ambas redes es necesario generar dos archivos de texto (*.txt) con el formato indicado para BioTapestry. Uno de estos archivos contiene la información del momento y lugar en el cual cada gen se expresa y el otro, el momento en el que cada interacción se activa. Estos archivos son posteriormente importados al archivo donde se generó la red originalmente (*.btp). Complementariamente se adjuntaron imágenes de hibridaciones *in situ* o inmunohistoquímicas, obtenidas de la literatura, en las que se muestra la expresión de algunos de los genes respectivos a ese momento de desarrollo.

1.3.- Primer nivel de comparación de las redes de interacciones: literatura

Una vez construidas las redes en base a datos de literatura se procedió a compararlas. La comparación correspondió a evidenciar la presencia de pares de ortólogos implicados en el desarrollo de la extremidad tanto de *Drosophila* como pez cebra. En esta primera comparación básicamente se sintetizó información obtenida de la literatura.

1.4.- Segundo nivel de comparación de las redes de interacciones: BLAST bidireccional

Una comparación solamente realizada a nivel de los datos encontrados en la literatura tiene sesgos. El primero de ellos se relaciona a que está restringido solo a aquello que otros investigadores ya hayan realizado. El segundo corresponde a que dentro de todo lo que se ha hecho existe la real posibilidad de que gran cantidad de información no sea encontrada al momento de hacer la revisión. De esta manera, la información con la que se construyen las redes es probablemente menor que la total disponible.

La manera con la que se buscó superar el segundo sesgo fue realizar un análisis bioinformático. Este consistió en un BLAST bidireccional. En este método se realizan dos BLAST. En el primero se buscan los posibles ortólogos de una secuencia aminoacídica en el proteoma del otro organismo. Una vez que se encuentra un(os) candidato(s) se toman esta(s) secuencias y se hace un BLAST contra el

proteoma del organismo original. En el caso de que se encuentre nuevamente la proteína inicial se puede decir que se ha encontrado un posible ortólogo. Se indica como posible, debido a que se ha encontrado que no siempre el mejor alineamiento corresponde a la proteína perteneciente al organismo filogenéticamente más cercano (Koski y Golding, 2001).

Debido a que *Drosophila* ha sido históricamente más estudiada que el pez cebra se asumirá que su red está más completa. Así todos aquellos genes que no se han encontrado como conservados a partir de los datos de literatura pueden encontrarse en alguna de las siguientes condiciones: (1) efectivamente no estén conservados, (2) estén conservados, pero no ha sido descritos o (3) estén conservados y descritos como tales, pero no fueron encontrados en la revisión. Por lo tanto, a modo de reducir la posibilidad de no detectar genes conservados por vacíos en la búsqueda y buscar posibles genes conservados no descritos, se realizó un BLAST bidireccional con todos aquellos genes de *Drosophila* que no se encontraron conservados en el desarrollo de la aleta pectoral de pez cebra. Los nombres y los respectivos códigos de los mismos se encuentran en la Tabla 1. Notar que en muchos casos aparecen más de una posible proteína (PA, PB, PC, etc.), lo cual es producto de procesamientos alternativos, sin embargo en varias ocasiones esto solo es resultado del proceso de anotación y no son experimentalmente válidos. Para el BLAST bidireccional se descargó las bases de datos de los proteomas de *Drosophila* (actualización 5.8) y pez cebra (Danio_rerio.Zv8.54) desde los sitios ftp de FlyBase y Ensembl, respectivamente.

Se consideraron 3 parámetros entregados por el programa para evaluar los alineamientos: % Identidad, Valor E y BitScore. Adicionalmente, se calculó el porcentaje de cobertura (Ec. 1). Donde la secuencia *query* correspondió a la secuencia de *Drosophila*.

$$\% \text{ Cobertura} = \text{largo de alineamiento} / \text{largo secuencia "query"} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

En este caso particular, lo primero que se hizo fue hacer un BLAST de todas las secuencias de *Drosophila* indicadas en la Tabla 1. A partir de los datos parseados se generó un archivo Excel con los mejores alineamientos (valores más altos de % Identidad, % Cobertura y BitScore; y más bajos de Valor E) de las secuencias de *Drosophila*. Luego, utilizando los mismos criterios solo se seleccionan los mejores alineamientos de cada caso.

Tabla 1: Genes a buscar en pez cebra

Nombre del gen	Número de acceso en FlyBase
<i>arm-PC</i>	FBpp0089033
<i>arm-PE</i>	FBpp0089031
<i>arr-PA</i>	FBpp0086821
<i>btd</i>	FBpp0071314
<i>cg-PI</i>	FBpp0288473
<i>crol-PB</i>	FBpp0079846
<i>d</i>	FBpp0075488
<i>disp</i>	FBpp0078314
<i>dpn-PA</i>	FBpp0087879
<i>dr-PA</i>	FBpp0084807
<i>dsh</i>	FBpp0073311
<i>ds-PA</i>	FBpp0077708
<i>EGFR-PA</i>	FBpp0071570
<i>elB</i>	FBpp0080208
<i>fas 3</i>	FBpp0080604
<i>ffj</i>	FBgn0000658
<i>fz2-PA</i>	FBpp0074796
<i>Grn-PA</i>	FBpp0081304
<i>klu-PA</i>	FBpp0075976
<i>Mad-PA</i>	FBpp0077302
<i>Noc-PA</i>	FBpp0080215
<i>odd-PA</i>	FBpp0077246
<i>pan-PA</i>	FBpp0088224
<i>pnt-PA</i>	FBpp0088656
<i>poxn-PA</i>	FBpp0086446
<i>Put-PA</i>	FBpp0082436
<i>rho</i>	FBpp0072578
<i>ru</i>	FBpp0072574
<i>sax-PA</i>	FBpp0087909
<i>Sgg-PA</i>	FBpp0070450
<i>Sgg-PA</i>	FBpp0070450
<i>Slmb-PA</i>	FBpp0083434
<i>Smo-PA</i>	FBpp0077788
<i>spitz</i>	FBgn0005672
<i>Sty-PB</i>	FBpp0073005
<i>tgo-PA</i>	FBpp0081483
<i>tkv-PC</i>	FBpp0078721
<i>trh-PA</i>	FBpp0072466
<i>trh-PB</i>	FBpp0110175
<i>trh-PC</i>	FBpp0111752
<i>ttv-PA</i>	FBpp0086624
<i>ubx</i>	FBpp0082795
<i>vn-PA</i>	FBpp0076790
<i>wnt5-PA</i>	FBpp0074394

En paralelo se realizó el segundo BLAST, aquí se alinearon todas las secuencias de pez cebra contra todas las de *Drosophila*. Esto hizo que los alineamientos del segundo BLAST no tengan sesgo. Como resultado de este procedimiento se generó un archivo que puede ser abierto por un programa procesador de texto (por ejemplo, Word). Aquí se buscó con que alinearon las secuencias de pez cebra presentes en los mejores alineamientos del primer BLAST.

Por error, algunos genes de pez cebra no se incluyeron en este segundo BLAST. Por ello se tuvo que realizar este procedimiento de manera on-line utilizando el *browser* de Ensembl. Los genes analizados de esta manera fueron: *btd*, *d*, *disp*, *dsh*, *elB*, *fas 3*, *ff*, *rho*, *spitz* y *ubx*.

En aquellos casos en los que se encontró coincidencia con las secuencias de *Drosophila*, se obtuvo como resultado que dicha pareja de secuencias corresponderían a posibles ortólogos. El trabajo de buscar las coincidencias y evaluar cuales eran los mejores alineamientos en base a los parámetros mencionados se hizo de forma manual.

Sobre la base de las parejas de ortólogos encontrados, se repitió el procedimiento de la búsqueda bibliográfica para los respectivos genes en pez cebra. Con esta nueva información las parejas de ortólogos encontrados se clasificaron en 2 grupos. Uno correspondía a genes efectivamente conservados con funciones descritas en el desarrollo de las extremidades de ambos organismos y el otro agrupaba a genes que tienen una función en el desarrollo de la pata de *Drosophila*, están en el proteoma del pez cebra, pero no se encontró información sobre su rol en la formación de la aleta pectoral. El primer grupo de genes fue incorporado a la red de pez cebra y la conservada. Mientras que el segundo grupo de genes pasó a conformar la lista de potenciales candidatos a buscar en la aleta pectoral del pez cebra.

1.5.- Construcción de la red de interacciones génicas conservadas

La construcción de la red de interacciones génicas conservadas busca cumplir con 2 objetivos: resumir aquellos genes y sus interacciones que se encuentran conservados en el desarrollo de extremidades de ambos organismos y utilizarla como una herramienta para planificar experimentos asociados a la búsqueda de potenciales genes conservados.

La red de interacciones conservadas posee 2 clases de genes. En primer lugar, están aquellos que efectivamente están conservados junto con sus respectivas interacciones. En segundo lugar, se han incluido todos aquellos genes que mediante la búsqueda bioinformática se han encontrado en el proteoma de pez cebra, pero no se sabe si se expresan en la aleta pectoral (se indican entre signos de interrogación). Por lo tanto, todos los genes incluidos corresponden a un subconjunto de aquellos descritos en el desarrollo de la pata de *Drosophila*. Aprovechando esta condición se incluyeron todas las interacciones posibles descritas en la red de *Drosophila*. Esto con el fin de encontrar posibles interacciones de los genes candidatos con genes efectivamente conservados. Ello sirve como un argumento para reforzar la suposición de su presencia en la aleta de pez cebra.

1.6.- Análisis cuantitativo de las redes de interacción génica

Para efectos de análisis se consideraron tres redes: (1) pata de *Drosophila* (“Mosca Completa”), (2) pata de *Drosophila*, sin incluir aquellos genes cuya expresión no está demostrada, pero participan en vías de señalización canónicas (“Mosca”), (3) aleta pectoral de pez cebra (“Pez”). La segunda red se incluye de manera de poder cuantificar el efecto en los parámetros globales de la red de haber incluido arbitrariamente algunos genes. A su vez, cada red fue subdividida en otras tres redes: (1) sólo con interacciones de activación (“activación”), (2) sólo con interacciones de inhibición (“inhibición”) y (3) con todas las interacciones sin distinción de activaciones o inhibiciones (“interacciones”).

La manera con la que se trabajaron estos datos es convirtiendo las redes dibujadas en BioTapestry en matrices de interacción en términos de “0” y “1”. Ellas corresponden a una tabla de doble entrada, en la cual cada línea representa un gen y las columnas aquellos genes sobre los que tiene (en ese caso se coloca un “1”) o no (en ese caso se coloca un “0”) efecto. Así al ver una fila se encuentran con un número “1” todos los genes sobre los que tiene efecto el gen correspondiente a esa fila; y al ver una columna se encuentran con un número “1” todos los genes que tienen efecto sobre gen correspondiente a esa columna. Esta representación permite al sumar todos los números de una fila obtener el número de genes sobre los que tiene efecto el gen correspondiente a esa fila, dicho de otro modo, el número de las salidas -OUT- de ese gen. Mientras que al sumar todos los números de una columna se obtiene el número de genes que tienen efecto sobre el gen correspondiente a esa columna, dicho de otro modo, el número de las entradas -

IN- de ese gen. Dado que cada red se separó en dos matrices, una de inhibición y otra de activación, esta información puede obtenerse por separado.

A partir de estas matrices se obtendrán descriptores básicos de la red como: número de nodos (n), número de interacciones observadas, interacciones máximas posibles (n^2), la conectancia de la red (Interacciones observadas/Interacciones máximas posibles) y el promedio de interacciones por nodo.

Además, con toda esta información se buscará si el histograma de frecuencias acumuladas de los grados (número de interacciones del nodo) de los nodos de las nueve matrices de interacción generadas tiende al comportamiento de una red de escala libre. Esto significa que posee pocos nodos altamente conectados y muchos con pocas conexiones. A modo general en este tipo de redes la probabilidad de que un nodo tenga d vecinos (interacciones), $P(d)$, es directamente proporcional al número de vecinos d elevado a $-\gamma$, donde γ es un valor particular para cada red. Descrito en forma de relación de proporcionalidad: $P(d) \propto d^{-\gamma}$ (Barabási y Albert, 1999; revisado por Wagner, 2003). Ello explica que dichos gráficos tengan la forma de exponenciales muy pronunciadas.

Una forma de comprobar esta condición es el obtener una regresión lineal al hacer un gráfico de doble logaritmo de la frecuencia acumulada estandarizada versus el grado. En este caso para cada matriz se pueden obtener dos gráficos. Uno correspondiente a las entradas -IN-, es decir, solo considerando las interacciones que llegan a los nodos. Mientras que el otro corresponde a las salidas -OUT-, es decir, solo considerando las interacciones que salen de los nodos. Notar que para un mismo número de interacciones, la forma en la que se distribuyen las frecuencias de grados en los IN y OUT no es necesariamente igual. Por lo tanto, finalmente se tendrán dieciocho gráficos. Estos resultados se analizarán a un nivel descriptivo utilizando como caracterizador de cada uno el coeficiente de correlación (R^2). Al momento de dibujar la línea de tendencia no se exigirá que la misma pase por el origen.

Este procedimiento se realizará únicamente con el interés de observar la existencia de alguna tendencia. Esto debido a que para poder determinar efectivamente si la red se comporta como una red de escala libre, es necesario tener nodos cuyos grados varíen por lo menos en tres órdenes de magnitud. Por ejemplo, nodos con 10, 100 y 1000 interacciones. Dado que en las redes estudiadas, a lo más, se logrará

cubrir un orden de magnitud solo se puede hablar de una “tendencia a una distribución según una ley de potencia (*power-law*)”. La relevancia biológica de este comportamiento si profundizará en la discusión.

Para explicar mejor el procedimiento se muestra un ejemplo en la Figura 8. Suponer que una red original ya fue separada en activaciones e inhibiciones. En la Fig. 8a se muestra la red de activaciones, mientras que la Fig. 8b corresponde a su respectiva matriz de interacciones. La conectividad de salidas (OUT) de cada gen se obtiene al sumar los términos de la fila respectivos al gen. A ello corresponde la columna “G. OUT” (Grados OUT). En tanto para obtener la conectividad de las entradas (IN) se suman los términos de la columna correspondiente a cada gen. A ello corresponde la fila “G. IN” (Grados IN). Notar que la suma total de los “Grado IN” y “Grado OUT” es igual y corresponde al total de interacciones de la red, en este caso 12. En la Fig. 8c y Fig. 8d se grafica un histograma de la distribución de frecuencias acumuladas OUT e IN; respectivamente (estos gráficos no se muestran en la tesis). Mientras que las Fig. 8e y Fig. 8f corresponden a los gráficos del logaritmo de la frecuencia acumulada estandarizada versus logaritmo del grado. La estandarización se hace respecto al total de nodos, en este caso 7.

Para los gráficos generados a partir de las matrices en las que no se hace distinción entre inhibiciones y activaciones (gráfico de IN y OUT) de Mosca y Mosca Completa se hizo un análisis extra. Este correspondió a un análisis de covarianza para comparar la homogeneidad de las pendientes. Para esto se trabajó con el programa STATISTICA® 6.0 y se ocupó la corrección de Bonferroni. El objetivo de esto es encontrar si existe alguna diferencia entre las pendientes en los gráficos que solo consideran entradas o salidas.

2.- Trabajo Experimental

2.1.- Preparación de sondas de RNA para hibridación *in situ*

El procedimiento para obtener las sondas anti-sentido para efectuar las hibridaciones *in situ* comienza con la obtención de los clones. Ellos se utilizaron para transformar bacterias mediante electroporación o shock térmico. A partir de estas colonias se creció un inóculo, desde el cual se purificó el plasmidio a través de una mini-prep. En el caso de encontrarse DNA se procedía a linearizar (toda la

noche) para confirmar la presencia del plasmidio deseado. En la Tabla 2 se indican las enzimas de restricción con las que se linearizó. Todas las enzimas y polimerasas son marca Fermentas. Una vez corroborada la presencia del plasmidio se hizo una maxi-prep. Para verificar la presencia de bandas siempre se utilizaron geles de agarosa al 1%. Las diferentes sondas de RNA anti-sentido se prepararon, a partir de clones referenciados en la Tabla 2.

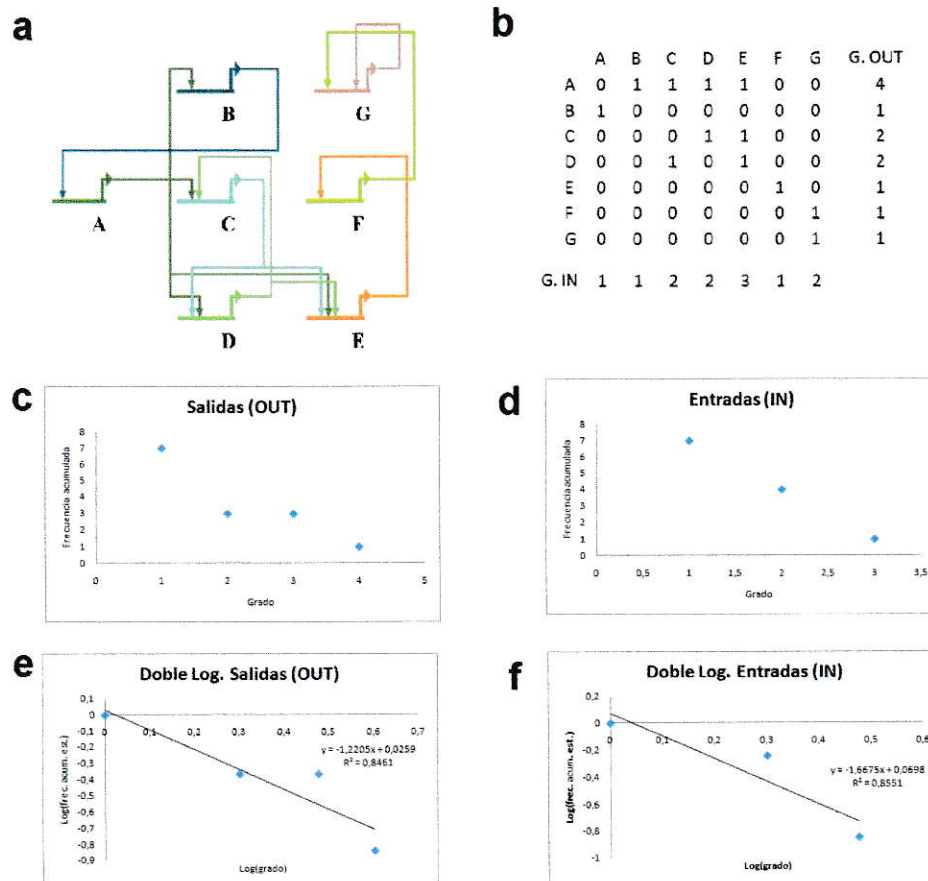


Figura 8: Explicación de la construcción de gráficos. (a) Red de activaciones. (b) Matriz de activaciones. La columna “G.OUT” muestra la suma de las respectivas filas y la fila “G. IN”, la suma de las respectivas columnas. Dichos valores representan la conectividad de cada nodo. Los figuras (c) y (d) muestran un histograma de frecuencias acumuladas de la distribución de grados de las salidas (OUT) y entradas (IN), respectivamente. Las figuras (e) y (f) corresponden a los gráficos del logaritmo de la frecuencia acumulada estandarizada versus el logaritmo del grado de las salidas (OUT) y entradas (IN), respectivamente.

Tabla 2: Clones utilizados y sus respectivas enzimas de restricción y RNA polimerasas

Gen	Enzima de restricción	RNA polimerasa	Referencia
<i>β-catenina-1</i>	EcoR1	SP6	(Kelly y col., 1995)
<i>actrIIa</i>	HindIII	T7	(Nagaso y col., 1999)
<i>actrIIb</i>	HindIII	T7	(Nagaso y col., 1999)
<i>bmpr1a</i>	EcoR1	T7	(Nikaido y col., 1999)
<i>fz8a</i>	BamH1	T7	(Kim y col., 2002)
<i>alk8</i>	HindIII	T7	Clonado por Keith A. Minoti

*Las sondas de Barhl1.1 y Barhl1.2 fueron prestadas por Rosario Villegas.

Luego, el DNA se purificó mediante extracción fenólica para eliminar las proteínas contaminantes. A continuación se realizó la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de aproximadamente 1 µg de DNA linearizado (la concentración se midió en un NanoPhotometer IMPLN), 10 µl de tampón de transcripción 10x, 2 µl de RNAsin (Promega) y 5 µl de la RNA polimerasa T7 ó SP6 correspondiente (Fermentas), dependiendo del promotor que posee el clon, 10 µl de NTPs 2,5 mM incluyendo el UTP dig-marcado y se completó con H₂O sin nucleasas hasta 50 µl. La mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C.

Para eliminar el templado, se agregó 5 µl de DNAsa (Promega) durante 5 minutos y se incubó a 37°C. Se determinó mediante la electroforesis en gel de agarosa 1% la presencia del RNA con el objetivo de estimar semi-cuantitativamente la concentración a utilizar durante el proceso de hidridación *in.situ*. Luego, se precipitó el RNA en una mezcla con 2 µl de EDTA 0,5M, 2 µl de LiCl 10M y 200 µl de etanol 100%. Esto se incubó toda la noche a -4°C. Al otro día se centrifugó 20 minutos a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70%. Luego, se centrifugó por 10 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante fue descartado y finalmente se resuspendió el RNA en 500 µl de tampón de hibridación *in situ* (Formamida 50%: 25 ml; SSC 5x: 12,5 ml de SSC 20x; Heparina 50 µg/ml: 50 µ de Heparina 50 mg/ml; Tween 0,1%: 50 µl; Ácido cítrico pH 6 1M: 460 µl de Ac. Cítrico 1M; completar con agua sin nucleasas hasta 50 ml) para ser utilizado o guardado a -20 °C. Usualmente, salvo se explicita lo contrario, se trabajó con la sonda a una concentración 2x.

2.2.- Hibridación *in situ*

Los embriones fueron descorionados manualmente y se fijaron en los estadios de 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf en PFA al 4% en PBS durante 3 horas. Luego, se hicieron 3 lavados de 5 minutos en PBS con Tween (PBST) y posteriormente uno de 10 minutos en metanol 100%. Finalmente, se guardan en metanol 100% a -20°C al menos 1 hora (los embriones se pueden almacenar en esta etapa a -20°C hasta 6 meses).

Los embriones se rehidratan con lavados de 5 minutos con las siguientes soluciones: metanol 75% en PBST, metanol 50% en PBST y metanol 25% en PBST. Posteriormente, se hacen 2 lavados de 5 minutos en PBST. Con el objetivo de eliminar los pigmentos, en algunos experimentos, se realizó el blanqueamiento de los embriones con más de 24 hpf con una solución que contiene 5,95 ml de agua destilada, 0,25 ml de SSC 20x, 0,5 ml de formamida y 3,3 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Los embriones se incubaron en esta solución aproximadamente 10 minutos expuestos a un tubo de luz fluorescente, la cual permite una reacción de oxidación de los pigmentos por parte del peróxido de hidrógeno. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBST durante 5 minutos cada uno. Otra forma de conseguir la eliminación de pigmentos fue manteniendo los embriones en medio E3 con PTU después de las 24 hpf. Para permeabilizar los embriones se realiza una digestión con proteinasa K (stock: 10 mg/ml). Los tiempos y concentraciones de incubación varían según el estadio. Ellos son indicados en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentraciones y tiempos de incubación con Proteinasa K dependiendo del tiempo de desarrollo

Tiempo de desarrollo (hpf)	Concentración de Prot. K (µg/ml)	Tiempo de incubación (min)
24	1	5
48	1,5	5
72	2	10

Una vez terminada la incubación se hace un lavado de 5 minutos con PBST y se procede a fijar incubando 20 minutos en PFA al 4% en PBS. Para quitar el fijador se realizan 5 lavados de 5 minutos con PBST. A continuación los embriones se incubaron con tampón de hibridación a 65°C durante 30 minutos y luego de hacer un recambio de la solución, se incubó toda la noche a 65°C con las sondas anti-sentido. Estas fueron previamente desnaturalizadas durante 10 minutos a 65°C.

Para el lavado de las sondas se hicieron incubaciones de 10 minutos a 65°C, en formamida/SSC 2x al 75%, formamida/SSC 2x al 50%, formamida/SSC 2x al 25%, SSC 2x y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2x. Luego, se hace un lavado de 5 minutos en PBST. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos los embriones se incubaron a temperatura ambiente por 4 horas en MAB+BMB+LS, solución bloqueante de sitios inespecíficos. En paralelo ocupando la misma solución se incubó, por el mismo tiempo y temperatura, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:2000). Para luego incubar los embriones durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina. El lavado del anticuerpo se realizó con 5 lavados de 20 minutos en PBST y 3 veces durante 5 minutos cada una en tampón AP. Finalmente, la tinción de los embriones se llevó a cabo con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP en oscuridad y durante el tiempo necesario para que apareciera marca sobre marca de fondo.

- Particularidades:

+ Sondas *barhl1.1 (barhl1)* y *barhl1.2 (barhl3)*: corresponden a sondas varias veces utilizadas por lo que se encuentran diluidas respecto a su concentración original (2x).

+ Sonda *alk8*: Se utilizaron 2 métodos: el descrito anteriormente y otro desarrollado por Fuentes y Fernández (comunicación personal, 2009). Con el protocolo tradicional se efectuó la hibridación con la sonda a concentración 4x y con el protocolo comunicado por Fuentes y Fernández (2009) se probó la sonda a concentración 2x y 4x. Cuando se trabajó con la sonda 4x se ocupó una temperatura de hibridación de 60°C.

2.3.- Inmunohistoquímica en embriones completos

Los embriones se fijan igual que en la hibridación *in situ*, solo que la incubación en PFA 4% en PBS es de 45 minutos. El primer día se procede de la misma manera que la hibridación *in situ* hasta después de la fijación. Luego, se hacen los siguientes lavados: 5 minutos en agua destilada, 7 minutos en acetona (a -20°C), 5 minutos en agua destilada y 5 minutos en PBST. Posteriormente, se transfieren a la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-pSmad-Rabbit (Cell signaling). Cuando se reveló con DAB se utilizó una

dilución de 1:100 en solución de bloqueo (20% Calf Serum + 1% DMSF en PBST) para el anticuerpo primario, mientras que cuando se reveló con anticuerpo secundario fluorescente, el anticuerpo primario se ocupó en una dilución de 1:50 en solución de bloqueo.

(i) Revelado con DAB: En el segundo día se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBST y luego se incuba toda la noche (4°C) con el anticuerpo universal secundario presente en el VECTASTAIN® UNIVERSAL Elite ABC KIT. Se trabaja con una dilución de 1:200. Finalmente, el tercer día corresponde a los pasos desde el 10 en adelante que aparecen en el protocolo de VECTASTAIN® UNIVERSAL Elite ABC KIT. El aumento en el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se basa en experiencias previas realizadas en el laboratorio con el mismo kit.

(ii) Revelado con anticuerpo secundario fluorescente: En el segundo día se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBST y luego se incuba toda la noche (4°C) con el anticuerpo secundario fluorescente. En este caso se utilizó Alexa 488 nm (Molecular Probes) en una dilución de 1:400. Además, una vez concluido el protocolo de inmunohistoquímica se realiza una incubación de 15 min. con ToPro3 a una concentración de 1 µM para teñir los núcleos.

2.4.- Fotografías

Los embriones en los que se realizaron hibridaciones *in situ* o inmunohistoquímicas reveladas con DAB para ser fotografiados fueron puestos en un medio con metilcelulosa al 4%. Se utilizó una lupa OLYMPUS MVX10 con una cámara Leica DFC300 FX (12730046) con el programa Leica FireCam (Apple Mac). El tratamiento de las imágenes se realiza con Microsoft Office Picture Manager.

Las inmunohistoquímicas reveladas con un anticuerpo secundario fluorescente e incubadas en ToPro 3 fueron fotografiadas en un microscopio confocal modelo LMS 510 Meta. Para tratar las fotos y hacer las reconstrucciones tridimensionales se ocupó el programa LSM 510.

RESULTADOS

1.- Redes de interacción génica

Las redes asociadas al desarrollo de la pata de *Drosophila* (Fig. 9) y la aleta pectoral de pez cebra (Fig. 10) fueron construidas en Biotapestry. Para una descripción detallada de las mismas revisar los Apéndices I (Desarrollo de la pata de *Drosophila*) y II (Desarrollo de la aleta pectoral de pez cebra).

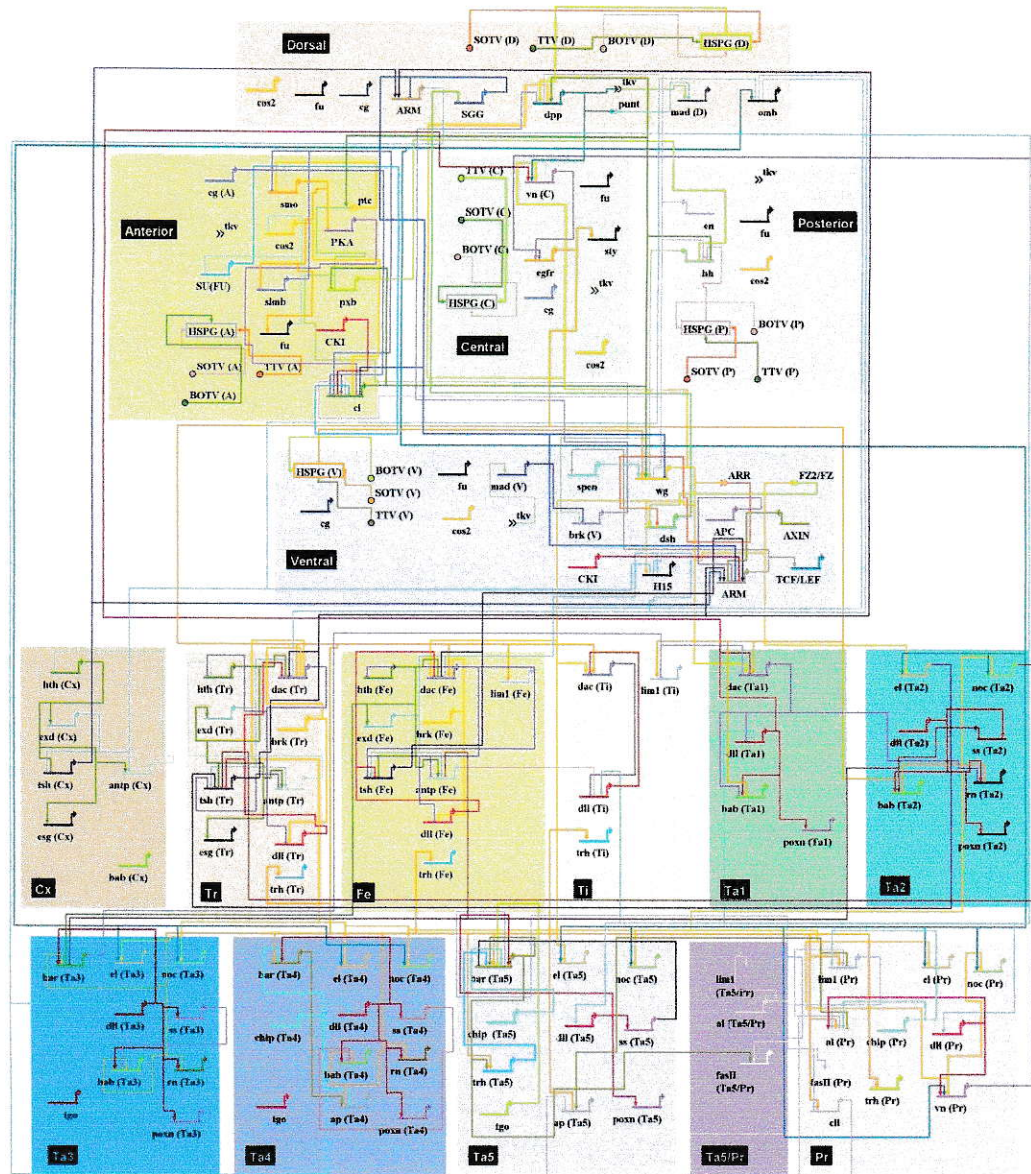


Figura 9: Red de Interacciones genéticas asociadas a la formación de la pata de *Drosophila*. El tiempo que se considera va desde el comienzo de la larva 2 (48 hrs AEL) hasta el final de larva 3 (120 hrs AEL). Respecto a las diferentes regiones indicadas, las primeras cinco hacen alusión a las zonas dentro del disco imaginal, mientras que las otras 11 se refieren a segmentos de la pata adulta: Dorsal, Central, Anterior, Posterior, Ventral, Cx (coxa), Tr (trocánter), Fe (fémur), Ti (tibia), Ta1 (tarso 1), Ta2, Ta3, Ta4, Ta5, Ta5/Pr (tarso 5/pretarso) y Pr (pretarso). Los genes incluidos de manera arbitraria son: APC, ARM, ARR, AXIN, BOTV, CKI, FZ/FZ2, PKA, PUNT, SGG, SLMB, SMO, SOTV, SPEN, SU(FU), TCF/LEF, TTV y HSPG (proteoglicano de heparan sulfato). El gen “punt” debería encontrarse escrito en mayúsculas (“PUNT”), pero por un problema del programa no se pudo incluir de esta manera. Por otro lado “H15” se ha anotado con mayúsculas, porque tradicionalmente se indica de esta manera. En este caso no significa que no esté descrita su expresión. Situación similar debiera ocurrir con “egfr”, sin embargo por un problema del programa tampoco pudo colocarse en mayúsculas. Las flechas indican activación y las

barras "T" inhibición. Para ver animación temporal y explorar en detalle las interacciones ver archivo "Pata.btp". Bibliografía en: "Bibliografía de redes.xls".

mesodermo), Aleta anterior, Aleta, Aleta posterior, mes. (mesodermo), mes. anterior, mes. posterior, AER (*apical ectodermal ridge*), AER dorsal, AER ventral y AER posterior. Los genes ubicados en la región “aleta” corresponden a aquellos genes cuya expresión es compartida entre la zona mesodermal y ectodermal de la misma, o bien, no está descrito en detalle. Igualmente, aquellos cuya expresión se encuentre descrita para toda la aleta o todo el mesodermo o todo el AER se ubicarán en las regiones denominadas “aleta”, “mes.” o “AER”, respectivamente. Las flechas indican activación y las barras “T” inhibición. Para ver animación temporal y explorar en detalle las interacciones ver archivo “Aleta pectoral.btp”. Bibliografía en: “Bibliografía de redes.xls”.

2.- Resultados BLAST bidireccional

Con el fin de encontrar aquellos genes conservados que no hayan sido reportados previamente o no se encontraron en la revisión bibliográfica se efectuó un BLAST bidireccional con los genes implicados en el desarrollo de la pata de *Drosophila* que no se encontraron relacionados con el desarrollo de la aleta pectoral del pez cebra. Los resultados se organizaron en dos listas. La primera corresponde a 10 genes que efectivamente se encuentran compartidos entre ambas estructuras, los cuales no habían sido encontrados durante la búsqueda en la literatura. Por otro lado, los genes cuya presencia no ha sido reportada en las aletas pectorales del pez cebra se muestran en la sección “5.- Genes candidatos a buscar” junto con la información que apoya su posible expresión y el resultado de su búsqueda por hibridación *in situ*. Para efectuar esta división fue necesario previamente hacer una revisión bibliográfica de los genes encontrados. Los genes presentados en la Tabla 4 fueron incluidos en las redes previamente presentadas.

Tabla 4: Proteínas conservadas no encontrados en la revisión bibliográfica.

Pez cebra	<i>Drosophila</i>	% Identidad	% Cobertura	E-Value	Función molecular
Spry2	Sty	44	21	1,00E-27	Prot. secreción putativa
Smad1	Mad	70	104	7,00E-174	Factor de transcripción
EGFR	EGFR	79	67	0	Receptor
Smo	Smo	43	55	1,00E-144	Proteína de membrana
Tcf711b*	Pan	51	32	9,00E-50	Factor de transcripción
Ets1b	Pnt	76	17	2,00E-43	Factor de transcripción
Osr2	Odd	85	12	1,00E-40	Factor de transcripción
Zfn503	Noc	59	9	7,00E-07	Factor de transcripción
Arnt2	Tgo	62	61	2,00E-141	Factor de transcripción
Ext1a**	Ttv	53	101	0	Glucuronosiltrasferasa

*notar que Tcf7 también se encuentra en la aleta.

**no se encuentra en aleta, sin embargo si están sus parálogos Ext1b y Ext1c.

3.- Comparación de la red génica implicada en el desarrollo de las extremidades de vertebrados y artrópodos

Para realizar la comparación de ambas redes se utilizarán ortologías descritas en la literatura y aquellas que fueron encontradas mediante el BLAST bidireccional. Notar que estas últimas principalmente corresponden a ortologías que si bien ya se habían reportado previamente no son tan frecuentemente mencionadas en la literatura referente al desarrollo de extremidades. Otro aspecto que es necesario tener en cuenta en esta comparación corresponde al inevitable sesgo de la misma. Por razones prácticas no se pudieron construir redes similares para otros organismos (pollo o ratón) cuya literatura está equivalente o mayormente desarrollada. El problema de esto pasa por el hecho de que es posible que ciertas situaciones excepcionales oculten alguna conservación más generalizada. Para efectuar las comparaciones inicialmente se revisarán las similitudes que existen en las diferentes vías de señalización canónicas y luego se compararán factores de transcripción o genes no asociados directamente a alguna vía particular. El énfasis será sobre aquellos aspectos en los que existen similitudes, pues es probable que parte de las diferencias sean artificios de la falta de estudio de dichos genes.

A modo general, se puede decir que se encontraron conservados 24 genes presentes en la red que representa el desarrollo de la pata *Drosophila*. Lo que corresponde a un 60% de los genes descritos con expresión en el disco imaginal de pata. En pez cebra, varios de estos genes poseen más de un parálogo (Fig. 11 y archivo “Ur apéndice.btp”).

3.1.- Vías de señalización canónicas

+ Vía de Hh/Shh

En primer lugar, me referiré a la vía de Hh/Shh, cuya comparación ya ha sido previamente indicada por Jiang y col. (1995). Es posible identificar casi la totalidad de los componentes de esta vía en las extremidades de ambos organismos. Partiendo por el morfógeno que participa en esta vía (*hh* en *Drosophila* y *shh* en pez cebra). Notar que en el pez hay otros dos parálogos que también poseen funciones en el desarrollo de la aleta, ellos son *echidna hedgehog (ehh)* y *tiggy-winkle hedgehog (twhh)* (revisado por Ochi y col., 2006). En lo que respecta al receptor, en la mosca existe sólo uno llamado *ptc*, mientras

que en el pez cebra hay 2 parálogos: *ptc1* y *ptc2*. De todos modos ambos poseen patrones de expresión y roles muy parecidos (Koudij y col., 2005). Una vez que Hh/Shh se ha unido a Ptc/Ptc1-2 este último libera la inhibición que efectúa sobre Smo, para el cual no se encontró más de un parálogo en pez cebra.

Una vez que la inhibición sobre Smo ha sido eliminada este último evita que Ci/Gli sea clivado con lo que entra al núcleo y actúa como factor de transcripción. En el caso de *Drosophila* se ha descrito solo a *ci*, sin embargo en pez cebra se han encontrado 3 parálogos con expresión en la aleta pectoral (*gli1*, *gli2* y *gli3*). *gli1* actúa primeramente como activador, mientras que *gli2* y *gli3* pueden actuar como represor o activador (revisado por Huangfu y Anderson, 2006), dependiendo si están o no clivados.

La manera en la que se evita este clivaje ha sido ampliamente descrita en *Drosophila*, más no tanto en pez cebra. En la mosca se sabe que *smo* evita la formación del complejo de proteólisis mediante la inhibición de componentes del mismo. Más específicamente de PKA y Slimb (Price y col., 2002; Lum y Beachy, 2004). Smo evita que la PKA fosforile ciertos residuos aminoacídicos de Ci. Además, se ha descrito un ortólogo para *fused* (*stk36*) en el pez cebra (revisado por Huangfu y Anderson, 2006). Éste antagoniza con *suppressor of fused*, *su(fu)*, el cual juega un rol crucial en la inhibición de la vía. Notar que *su(fu)* se ha encontrado en ambos animales. Para ambos organismos también se ha descrito un rol antagónico de *cos2* con *ci/gli* (Gilbert, 2003; Lum y Beachy, 2004; Tay y col., 2005). Pero, existen componentes importantes de la vía que no han sido descritos en la aleta pectoral de pez cebra. Uno de ellos es la CKI, cuyo rol se asocia a la fosforilación de Ci (revisado por Huangfu y Anderson, 2006). El otro es Dispatched, proteína de transmembrana asociada a la liberación de Hh (Burke y col., 1999).

Complementariamente, hay genes regulados por esta vía en el pez cebra cuya presencia no se ha documentado en la mosca. Ellos corresponden principalmente a genes Hox. Entre los cuales podemos mencionar a: *hoxa13*, *hoxd13*, *hoxa9*, *hoxa11*, *hoxa10*, *hoxc6a*, *hoxd12* y *hoxd11* (Neumann y col., 1999; Gibert y col., 2006). También pareciera que el control inicial de la vía de Hh/Shh en ambos organismos es diferente. En el pez cebra resulta esencial la presencia de RA (Power y col., 1999), el cual activa entre otros genes a *dHAND* el cual es responsable de la activación de *shh* (Welscher y col., 2001; Gibert y col., 2006; Lucas y col., 2006). Tanto la maquinaria de síntesis y degradación de RA al igual que *dHAND* no han sido descritos en la pata de *Drosophila*.

Además, existen variadas diferencias a nivel de esta vía entre vertebrados y *Drosophila*. Una diferencia importante descrita al comparar esta vía de señalización entre mamíferos y *Drosophila* corresponde a cómo opera la vía en sí. Pese a existir una importante conservación entre las secuencias de *cos2*, *su(fu)*, *smo* y *ci/gli*. En las células de mamífero la actividad de *cos2* está prácticamente ausente y la inhibición de la vía depende esencialmente de *su(fu)* (Varjosalo y col., 2006). No obstante, hay que mencionar que la identificación de homólogos de *cos2* ha sido muy dificultosa, debido a que existe una gran cantidad de genes relacionados con kinesina en los genomas de vertebrados. Por ejemplo, en mamíferos existen dos proteínas *cos2-like*, *kif7* y *kif27*, que comparten altos niveles de identidad (22-23%) y similitud (37-38%) con *cos2* de *Drosophila* (revisado por Huangfu y Anderson, 2006). De hecho, se ha encontrado que *kif7*, en mamíferos, interactuaría físicamente con los factores de transcripción Gli regulando su estabilidad y proteólisis. De esta manera, tendría un rol muy similar a *cos2* en *Drosophila* (Cheung y col., 2009).

Por otro lado, el mecanismo de ubicación celular de *smo* de mamíferos y de mosca también presentaría diferencias (revisado por Huangfu y Anderson, 2006). Además, el rol que tiene *fused* pareciera ser muy diferente en ratones que en peces o moscas. En los primeros *fu* se expresa extensamente en el embrión en desarrollo incluso en los tejidos que responden a *shh*. De hecho, ratones que carecen de la actividad de esta proteína nacen sin tener aparentes problemas en las estructuras en las que se ve involucrada la vía de Shh (revisado por Huangfu y Anderson, 2006). Varios de estos aspectos resultan muy sugerentes de investigar en el pez cebra. Pese a esas diferencias, el efecto que esta vía tiene en la polarización de la estructura en ambos casos es muy parecido. El morfógeno *hh/shh* secretado desde la región posterior, en ambos casos tiene un rol polarizante en el eje A/P. De hecho, existen experimentos en los que expresiones ectópicas generan duplicaciones especulares de la estructura. Esto ha sido visto tanto en alas de *Drosophila* como en extremidades de pollo (revisado por Capdevila y Johnson, 2000). En tanto, aplicaciones sistemáticas de RA en los primeros estadios de desarrollo de la aleta pectoral producen un territorio de expresión ectópica de *shh* en la zona anterior de la aleta. Ello produce un patrón especular de expresión de esta proteína (Akimenko y Ekker, 1995b).

Esto evidencia como una misma perturbación genera efectos morfológicos similares en especies muy lejanas. Ello puede ser interpretado como conservación o convergencia. En el caso de que fuese la última posibilidad, estaríamos frente a un ejemplo en el cual un mismo sistema, en este caso una vía de señalización, es reclutado de manera independiente en la evolución para formar estructuras análogas.

+ Vía de *Wg/Wnt*

En segundo lugar, nos referiremos a la vía de Wnt. Tanto en la mosca como en el pez cebra se ha descrito la presencia del ligando de esta vía. En el caso de *Drosophila* es *Wg* (revisado por Chen y Struhl, 1999) mientras que en la aleta pectoral pez cebra se han reportado varias proteínas de esta familia: *Wnt2b* (Mercader y col., 2006), *Wnt3a* (revisado por Ng y col., 2002) y *Wnt7a* (revisado por Mercader, 2007). Además, *wnt5a* (Yokoi y col., 2003) se ha reportado en la aleta pectoral de medaka. Otro componente de la vía que se ha descrito en la aleta del pez cebra es *tcf7*, el cual forma parte de un complejo que activa la transcripción río abajo del ligando Wnt. Además, se ha descrito la presencia de otra proteína importante en este complejo *lef* (Nagayoshi y col., 2008). Sin embargo, en el disco imaginal de pata no se ha descrito la presencia de *pangolin* (sinónimo de *dTCF*).

Sin embargo, existen varios otros componentes de la vía de señalización que no han sido reportados en el pez cebra. Partiré mencionando a los receptores del ligando que en se denominan *fz/fz2* y *arr* (revisado por Schweizer y Varmus, 2003). Tampoco se encontró registro del complejo de quinasas *shaggy/zeste white 3* (*sgg/zw3*), sinónimo de *gsk3 β* , ni de *caseína quinasa 1 α/ϵ* (*ck1 α/ϵ*). Estas proteínas son importantes, dado que mediante la fosforilación que efectúan sobre Arm inhiben la vía (revisado por Svendsen y col., 2000). Complementariamente, *Dsh* que es la proteína que inhibe este complejo de degradación cuando la vía se encuentra activa (Miléitch y col., 2000; revisado por Lin y col., 2003) tampoco ha sido reportada en la aleta.

+ Vía de *Dpp/Bmp*

Una tercera vía de señalización que es compartida en la formación de extremidades en ambos organismo es la vía de *Dpp*, o bien llamada vía de *Bmp* en vertebrados. En *Drosophila*, su ligando corresponde a *dpp* (revisado por Angelini y Kaufman, 2005). En el pez cebra existen dos parálogos para

este gen, *bmp2b* y *bmp4*, los cuales presentan expresión en la aleta pectoral (Norton y col., 2005; Rothschild y col., 2009). Pese a encontrarse el ligando no se ha descrito la presencia de los potenciales receptores (*tkv*, *punt* o *sax*) o el mensajero citosólico (*mad*) en la aleta del pez cebra. Tampoco se encontró patrón de expresión para el ortólogo del represor transcripcional de *dpp* llamado *brk* (Estella y Mann, 2008). Una situación diferente ocurre con uno de los genes que es activado por *dpp/bmp2-4*. Este es el caso de *omb*, ortólogo de *tbx2-3* en pez cebra (Ruvinsky y col., 2000). *omb* se expresa en la región dorsal del disco imaginal de la pata, igualmente *tbx2* y *tbx3* ha sido descritos en la aleta del pez cebra (Ruvinsky y col., 2000; Robeiro y col., 2007).

Por otro lado, una proteína que está involucrada en las tres vías de señalización es *engrailed* (*en/eng*). En *Drosophila*, tiene un rol inhibitorio con *dpp* y *wg* (Kyoda y col., 1999; Campbell y col., 2000) y activador con *hh* (Kyoda y col., 1999; Morata y col., 2001). En el pez cebra existen 2 parálogos, *eng1* y *en1b*, solo *eng1* tiene expresión en las aletas (Hatta y col., 1991; Force y col., 1999). Sin embargo, no se han descrito interacciones con los respectivos ortólogos de *dpp*, *wg* o *hh* en la aleta.

Lateralmente, se pueden mencionar a los proteoglicanos de heparan sulfatos (HSPG), los cuales si bien no son parte de una vía de señalización en particular, tienen un rol fundamental al estabilizar los ligandos secretados de las mismas (revisado por Bornemann y col., 2004). Por ello han sido vinculados con la funcionalidad de diferentes vías, por ejemplo la vía de Shh. Varias de las enzimas implicadas en la síntesis de estas moléculas se encuentran en las patas/aletas. Por ejemplo en *Drosophila* (no siendo descrita su expresión en la pata), Toutvelu (*Ttv*) actúa como co-polimerasa para la síntesis de HS-GAG (Han y col., 2004). En tanto sus respectivos ortólogos en pez cebra, *ext1b* y *ext1c*, han sido descritos en la aleta (Siekman y Brand, 2005).

Al comparar los patrones de expresión de los diferentes componentes de estas vías de señalización se encuentra una buena correlación en lo que respecta a la ubicación relativa de cada una. La vía de Hh/Shh posee un rol posteriorizante y en ambos organismos modelos se puede evidenciar que el morfógeno es secretado desde la zona posterior de la estructura.

En lo que respecta a la polaridad D/V se evidencia que las vías de señalización se encuentran en ubicaciones invertidas (revisado por De Robertis, 2006). Así en el disco imaginal de pata de la mosca *wg*

es expresado en la región ventral (revisado por Angelini y Kaufman, 2005). Mientras que en la extremidad de vertebrado la vía Wnt tiene predominancia en la región dorsal (revisado por Niswander, 2003). Complementariamente, *dpp* se expresa en la zona dorsal del disco imaginal (revisado por Angelini y Kaufman, 2005) y los genes Bmp lo hacen en la región ventral de la extremidad de vertebrado (revisado por Niswander, 2003). Por la forma de la aleta, no es frecuente que al reportar la expresión de un gen sea posible identificar si se encuentra en la zona ventral o dorsal. No existen muchos reportes específicos sobre la ubicación dorsal o ventral en la aleta de un determinado gen. Lo mencionado anteriormente se refiere a datos obtenidos de pollo y/o ratón.

+ *EGFR* y *Fgf*

EGFR se expresa en el centro del disco imaginal y se asocia a la diferenciación de los segmentos más distales (revisado por Campbell y col., 2005). En pez cebra se ha descrito la presencia de su ortólogo en cerebro, retina y las yemas de las aletas pectorales (Goishi y col., 2003). Además, ha sido descrito que la vía EGFR-Ras tiene un rol en la formación de las articulaciones de la extremidad de vertebrados (revisado por Galindo y col., 2005). Sin embargo, no fueron encontrados ortólogos de otras proteínas asociadas a EGFR (Vn, Rho, Ru, Klu o Trh) en la aleta del pez cebra.

En la pata de *Drosophila* no se encuentra ningún gen que sea similar a los Fgf (Lecuit y col. (1997). En los vertebrados, estas proteínas tienen roles fundamentales asociados a proliferación y mutaciones en las mismas llevan a que no se forme la estructura o posea un tamaño reducido. Ejemplos de esto son los mutantes de *fgf24* (Fischer y col., 2003) y *fgf10* (Norton y col., 2005). Pese a no encontrarse los miembros de esta familia si se han descrito ciertas proteínas que tienen roles antagónicos con los Fgf. Ellas son las *sprouty*. En la pata de *Drosophila* se encuentra *sty*, mientras que en la aleta del pez cebra hay expresión de *spry2* y *spry4* (Fürthauer y col., 2004).

Interesantemente, los EGFR corresponden a receptores tirosina quinasa (RTK) al igual que los Fgfr (Campbell y col., 2002). Notar que varios Fgfr se expresan en la aleta de pez cebra, entre ellos están *fgfr2* y *fgfr2c* (Harvey y col., 2004; Norton y col., 2005). Dado que el sitio de expresión de *EGFR* corresponde al centro del disco imaginal, por tanto la zona más distal de la pata del adulto, se ha comparado el gradiente formado por los Fgf en vertebrados. En ellos los Fgf se secretan desde la punta de

la extremidad en desarrollo (revisado por Campbell y col., 2002). Sin embargo, ambos gradientes se diferencian en el rol principal que tienen estas proteínas. En el caso de *Drosophila*, *EGFR* se ha asociado con la diferenciación de segmentos, mientras que en vertebrados los Fgf se relacionan principalmente con proliferación celular.

3.2.- Factores de transcripción y otros genes conservados

La polarización en el eje próximo/distal ha sido ampliamente estudiada en *Drosophila*, debido a que muchos genes se han asociado a la formación de segmentos particulares. Ello facilita la evaluación del efecto fenotípico de la pérdida de los mismos. A su vez, varios de estos genes tiene roles en el desarrollo de la aleta en el pez cebra.

En la pata de *Drosophila*, existen tres proteínas que actúan en conjunto (*hth/exd/tsh*; revisado por Kojima, 2004), sus respectivos ortólogos se han encontrado en la aleta del pez cebra. La principal diferencia pasa por el hecho de que en algunos casos existe más de un parálogo. Así los ortólogos de *hth* en el pez cebra son los genes *meis*. *meis 1.1* y *meis 3.1* han sido descritos en la aleta, mientras que la presencia de *meis 2.1* se mantiene en debate (Andreazzoli y col., 2001; Waskiewicz y col., 2001; Begemann y col., 2002).

De la misma manera que Hth ayuda a que Exd sea translocado al núcleo, las proteínas Meis estabilizan a Pbx4 mediante interacciones proteína-proteína. Por otro lado, la proteína Tsh1 (expresada en la aleta) es activada ante la presencia de RA (Wang y col., 2007). Mayores estudios podrían revelar si *meis* activa a *tsh1* del mismo modo que *exd* lo hace con *tsh*. (Wu y Cohen, 1999; Kojima, 2004). En otros vertebrados también se ha encontrado conservada la regulación de *hth/meis* sobre *exd/pbx* (revisado por Prpic y col., 2003). En la mosca *exd* es absolutamente dependiente de *hth* para su localización nuclear mientras que en vertebrados las proteínas *pbx* son menos dependientes de *meis*. Esto está descrito en consideración de la extremidad de ratón. (Waskiewicz y col., 2001)

Otro grupo de proteínas que actúan de manera conjunto en ambos organismos son *ss/ahr* y *tgo/arnt*. En *Drosophila*, *ss* y *tgo* actúan en conjunto en los segmentos distales de manera inhibitoria con *bar* (Kozu y col., 2006). *Ss* se ha asociado a la metabolización de hidrocarburos aromáticos policíclicos mientras que *Tgo* posee un dominio de bHLH-PAS. Esta última cuando se acompleja con *Ss* entra al

núcleo y activa procesos de transcripción (Duncan y col., 1996). Una interacción similar sucede en la aleta de pez cebra con los correspondientes ortólogos (cada uno con 2 parálogos): *ahr* y *arnt*, respectivamente (Andreassen y col., 2002).

Daschund es una proteína que tiene un importante rol en la determinación de los dominios mediales de la pata de *Drosophila* (revisado por Angelini, 2005). Sus correspondientes ortólogos en pez cebra (*dachA*, *dachB* y *dachC*) igualmente se expresan en la aleta pectoral (Hammond y col., 2002). Al comparar las secuencias proteicas de Dac en *Drosophila* y vertebrados se encuentran 2 dominios altamente conservados en el amino y carboxilo terminal, ellos son DD1 y DD2, ambos implicados en la interacción con otros factores de transcripción (Kida y col., 2004).

Un grupo de factores de transcripción ampliamente estudiado en vertebrados corresponde a los genes *hox*. No fue posible encontrar ortólogos en la pata de *Drosophila* (en literatura o mediante el BLAST bidireccional) para la gran mayoría de aquellos que se expresan en la aleta. Es posible que esto sea producto de cómo se efectuó la búsqueda. Ello consistió en buscar solo proteínas de *Drosophila* en el pez cebra y no al revés. No obstante, uno de ellos llamado *hox11* (sinónimo de *tlx3a*) posee un ortólogo en *Drosophila* llamado *cll*, sinónimo de *C15*. Este gen interactúa con *al* para inhibir a *bar*, sin embargo en vertebrado no se ha reportado ningún tipo de interacción entre *hox11* y alguno de los ortólogos vertebrados de *al* (Kojima y col., 2005). Kojima y col. (2000) han propuesto que la inhibición que *bar* ejerce sobre *al* podría encontrarse conservada en el desarrollo de extremidades en vertebrados.

En *Drosophila*, *apterous* tiene un rol importante en la diferenciación de los segmentos distales (revisado por Kojima, 2004). Su ortólogo en vertebrados *lhx2* se expresa en la aleta de pez cebra (Seth y col., 2006). *ap* actúa de manera similar a *lhx2* expresándose en la punta de la pata y siendo requerido para el crecimiento. El gen *lmx1* de pez cebra se expresa en la aleta y comparte un dominio con *ap*, sin embargo no es su ortólogo real. Existe un ortólogo de *lmx1* en el genoma de *Drosophila*, pero no se expresa en las patas (revisado por Pueyo y col., 2000).

Interesantemente, si solo se considera el rol de *ap* en las alas de la mosca se evidenciará que se expresa en la región dorsal y es requerido para crecimiento y diferenciación de la misma. En vertebrados, *lmx1* tiene un rol asociado a la diferenciación dorsal, mientras que *lhx2* se relaciona con crecimiento

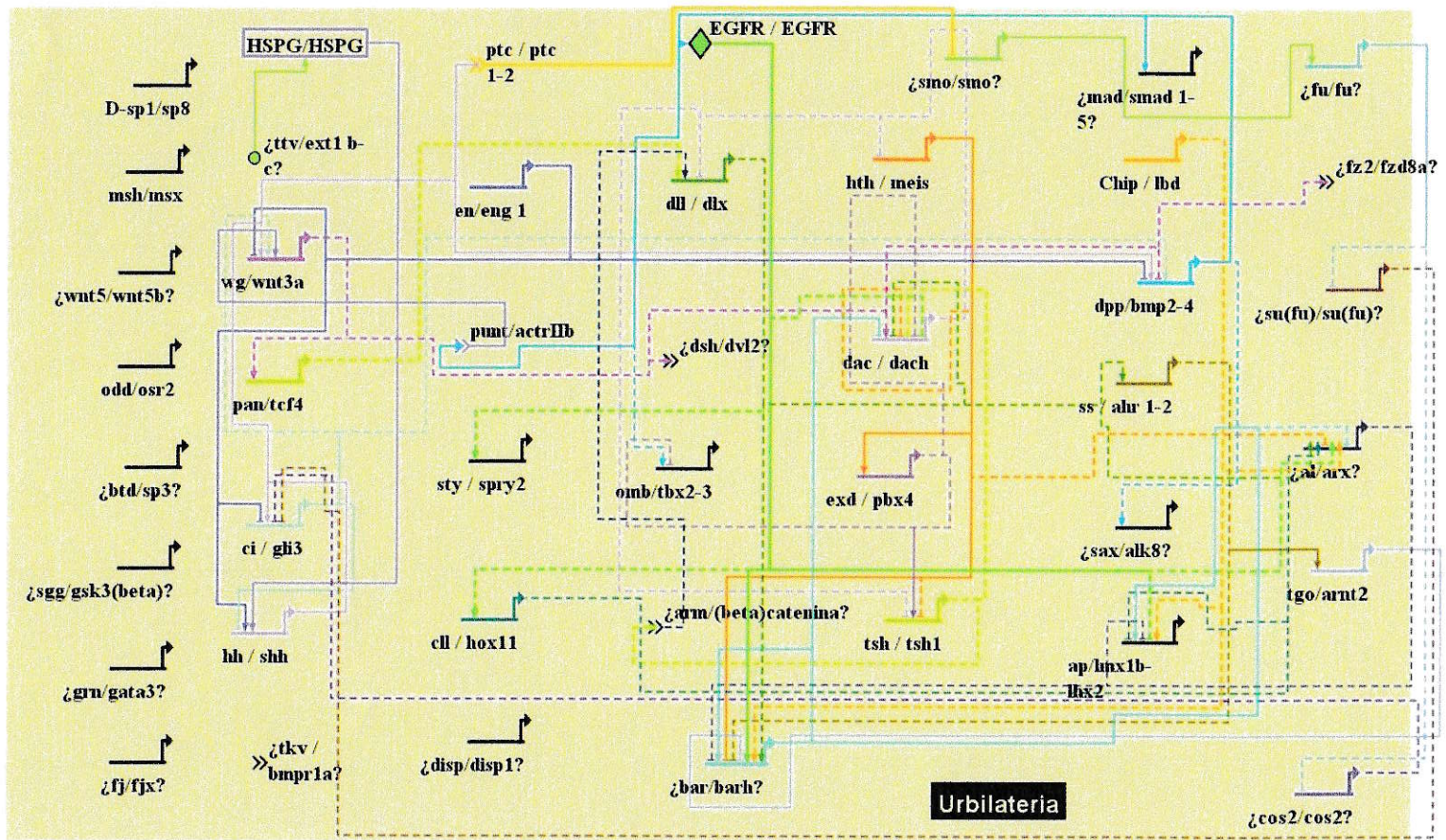
(Milán y col., 2001). Esto se ha tomado como evidencia de que la función de *ap* en *Drosophila* es desarrollada por dos proteínas diferentes en vertebrado (Eisenberg y col., 1992). No obstante, los mutantes de *ap* solo pueden ser rescatados con *lhx2* (revisado por Pueyo y col., 2000).

Funcionalmente relacionado con *ap* se encuentra *chip*, el cual corresponde a un co-factor que posee dominios de homodimerización entre proteínas LIM. Se expresa en todo el disco imaginal, pero es funcional en los segmentos más distales (Pueyo y Couso, 2004). En pez cebra se han reportado 3 parálogos, *lbd1*, *lbd2* y *lbd3*, con expresión en la aleta pectoral (Toyama y col., 1998).

En el disco imaginal de pata, alrededor del territorio de expresión de *ap* se encuentra *msh* (Lu y col., 2000). Esta proteína tiene cuatro parálogos (*msxA*, *msxB*, *msxC* y *msxD*) (Akimenko y col., 1995a; revisado por Géraudie, 1999) que se expresan en la aleta pectoral y aleta larval continua de pez cebra. En el disco imaginal de ala posee roles dorsalizantes y se encuentra bajo el control de *ap* (Milán y col., 2001).

Un factor de transcripción que ha sido descrito en gran cantidad de estructuras con morfología apendicular es *dll* (Panganiban y col., 1997). En el disco imaginal de la pata de *Drosophila* se expresa en la zona central que se corresponde con los segmentos más distales (revisado por Kojima, 2004). En el pez cebra se han descrito 4 parálogos con expresión en la aleta, ellos son *dlx2* (Neumann y col., 1999), *dlx3*, *dlx4* (Hoffman y col., 2002) y *dlx5* (Quint y col., 2000). Todos ellos se expresan en la zona más distal, el AER. Otra proteína con dominio de dedos de Zn que está compartida entre ambas estructuras es *odd/osr2* (Tena y col., 2007), en *Drosophila* se ha descrito que se encuentra río debajo de Notch y está implicada en la formación de articulaciones (Hao y col., 2003).

Finalmente, me referiré a la similitud que existe entre *D-sp1* (*Drosophila*) y *sp8* (pez cebra). Ambas proteínas corresponden a factores de transcripción con dominios de dedos de Zn y en análisis filogenéticos se agrupan muy próximas. En ratón, *sp8* tiene que ver con procesos de crecimiento de la extremidad y es necesario para la mantención del AER (Beermann y col., 2004), estructura donde se expresa en el pez cebra. En *Drosophila*, *D-sp1* se relaciona con la especificación temprana de la extremidad (Beermann y col., 2004; revisado por Kojima, 2004).



<Figura 11: Red de Interacciones génicas conservadas asociadas a la formación de extremidades. Los genes mostrados aquí tienen expresión en la aleta pectoral de pez cebra y la pata de *Drosophila*. Aquellos que aparecen entre signos de interrogación participan en el desarrollo del disco imaginal de la pata de *Drosophila* y se encuentran en el proteoma de pez cebra, mas no se ha probado su expresión en la aleta pectoral. Excepto por “¿ttv/ext1 b-c?”, el cual tiene expresión en la aleta, pero no ha sido reportada su presencia en el disco imaginal. Las interacciones con línea sólida se han reportado tanto en pez cebra como en *Drosophila*. Las interacciones con línea entre cortada corresponden a interacciones descritas solo para el desarrollo del disco imaginal de pata de *Drosophila*. En la animación temporal se muestran 3 momentos (1, 2 y 3). El primero corresponde a los genes e interacciones encontrados en base a solo revisión bibliográfica, el segundo, corresponde a todos los genes e interacciones conservadas incluidos gracias al BLAST bidireccional y el tercero, incluye todos los genes posiblemente conservados y las interacciones entre ellos descritas para el desarrollo de la pata de *Drosophila*. “EGFR/EGFR” se ha incluido en forma de rombo debido a que en algunas publicaciones se refieren a la vía en forma genérica y en otras solo al receptor (*EGFR*). “Chip/lbd” debiera estar escrito con minúsculas (“chip/lbd”), pero por un problema del programa no se logró. Las flechas indican activación y las barras “T” inhibición. Para ver animación temporal y explorar en detalle las interacciones ver archivo “Ur apéndice.btp”.

4.- Análisis cuantitativo de las redes

Como segunda aproximación comparativa se realizó un análisis cuantitativo de las redes. Para esto ellas se transformaron en matrices de interacción. Además, se aprovechó de generar una matriz de interacción para las interacciones en la pata de *Drosophila*, la cual carece de todos los genes e interacciones que fueron arbitrariamente incluidos. Los descriptores básicos se presentan en la Tabla 5. Ellos corresponden al número de nodos (n), las interacciones observadas, interacciones máximas posibles (n^2) y la conectancia (interacciones observadas/interacciones máximas posibles).

Tabla 5: Descriptores básicos de las redes

	Nodos (n)	Int. Máx. (n^2)	Int. Obs.	Conectancia
Mosca Completa Activación	58	3.364	72	0,021
Mosca Completa Inhibición			64	0,019
Mosca Completa Interacciones			136	0,040
Mosca Activación	40	1.600	53	0,033
Mosca Inhibición			49	0,031
Mosca Interacciones			102	0,064
Pez Activación	62	3.844	72	0,019
Pez Inhibición			10	0,0026
Pez Interacciones			82	0,021

El número de nodos en las dos redes originales es muy similar (58 nodos en la red de mosca y 62 en la red de pez cebra). Inclusive el número de interacciones de activación y por lo tanto también su

conectancia son muy similares. Sin embargo, las interacciones de inhibición en la red de pez cebra son mucho menores. Llegando a ser su conectancia un orden de magnitud menor. Al comparar las dos redes de *Drosophila* se encuentra, sorpresivamente que la conectancia de la red sin los genes incluidos arbitrariamente es mayor que la que tiene la red que los posee. Finalmente, al observar los parámetros obtenidos de las matrices de solo interacciones, sin considerar si son inhibiciones o activaciones, se encuentran simplemente las sumas de las matrices de las cuales se compone (inhibiciones y activaciones).

El segundo análisis cuantitativo que se realizó consistió en construir los gráficos logarítmicos del histograma de frecuencias acumuladas versus el grado del nodo (Fig. 12, 13 y 14). Estos resultados se analizarán a un nivel descriptivo utilizando como caracterizador de cada uno el coeficiente de correlación (R^2). Los gráficos se presentarán a continuación y un resumen de los R^2 de cada regresión se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Coeficientes de correlación (R^2) de los distintos gráficos construidos

Gráfico		R^2
Mosca Completa Activación	Salidas (OUT)	0,9592
	Entradas (IN)	0,8334
Mosca Completa Inhibición	Salidas (OUT)	0,9298
	Entradas (IN)	0,8860
Mosca Completa Interacciones	Salidas (OUT)	0,8607
	Entradas (IN)	0,8711
Mosca Activación	Salidas (OUT)	0,8505
	Entradas (IN)	0,9012
Mosca Inhibición	Salidas (OUT)	0,9117
	Entradas (IN)	0,8575
Mosca Interacciones	Salidas (OUT)	0,7756
	Entradas (IN)	0,9083
Pez Activación	Salidas (OUT)	0,9147
	Entradas (IN)	0,9629
Pez Inhibición	Salidas (OUT)	0,9223
	Entradas (IN)	0,6108
Pez Interacciones	Salidas (OUT)	0,9003
	Entradas (IN)	0,9777

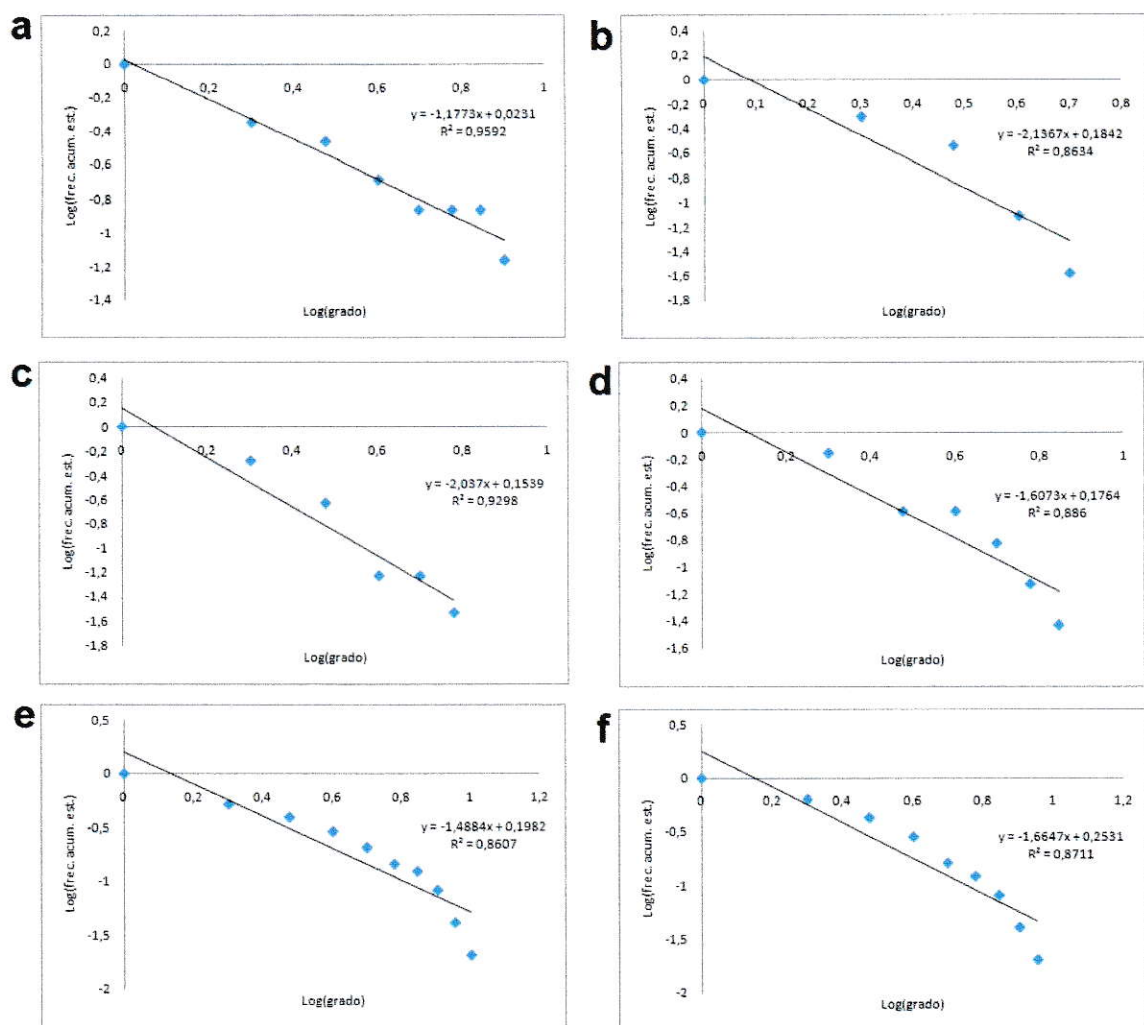


Figura 12: Gráfico logarítmico de las frecuencias acumuladas estandarizadas versus el grado obtenido desde la matriz de Mosca Completa. (a) activaciones (salidas, OUT), (b) activaciones (entradas, IN), (c) inhibiciones (salidas, OUT), (d) inhibiciones (entradas, IN) (e) interacciones (salidas, OUT), (f) interacciones (entradas, IN).

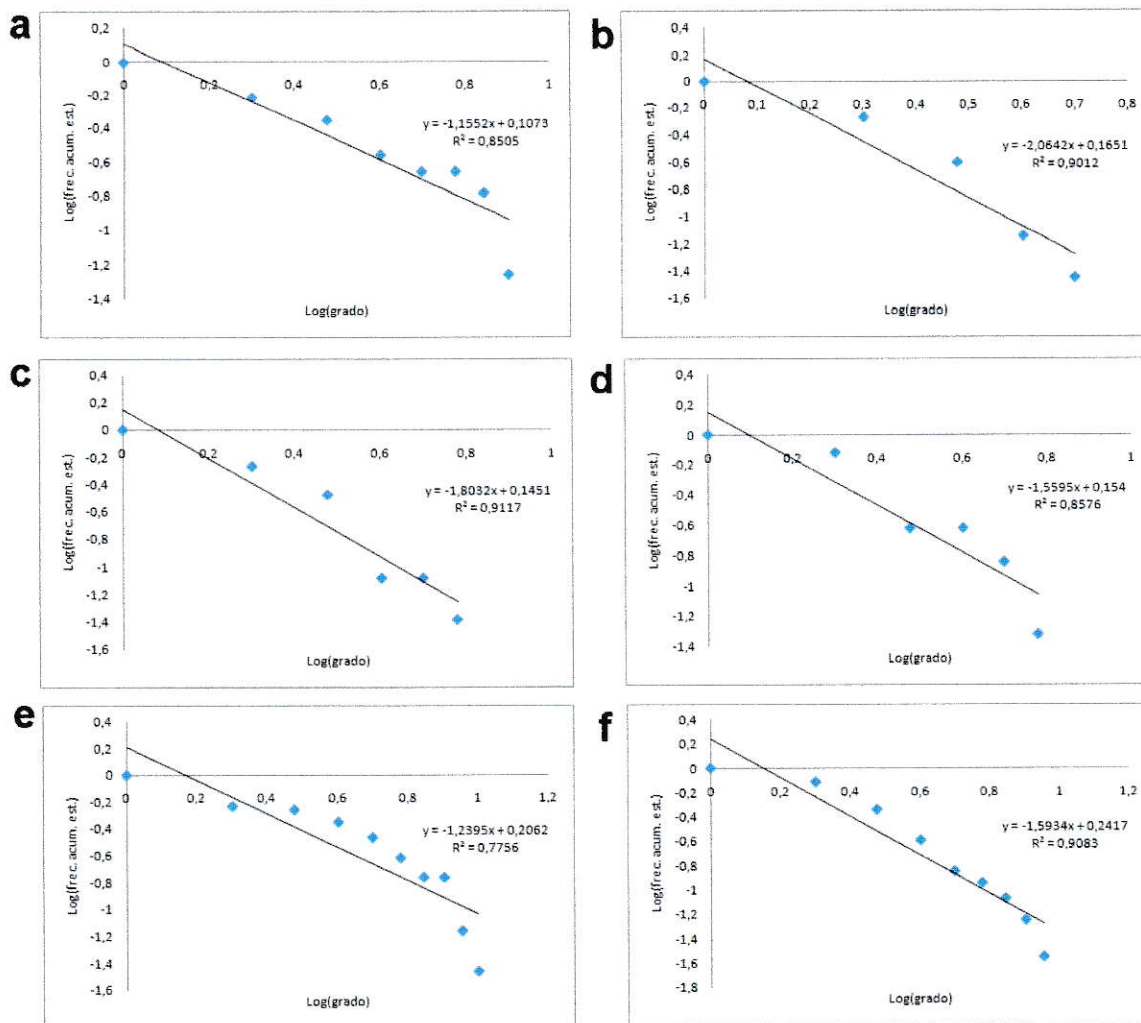


Figura 13: Gráfico logarítmico de las frecuencias acumuladas estandarizadas versus el grado obtenido desde la matriz de Mosca. (a) activaciones (salidas, OUT), (b) activaciones (entradas, IN), (c) inhibiciones (salidas, OUT), (d) inhibiciones (entradas, IN) (e) interacciones (salidas, OUT), (f) interacciones (entradas, IN).

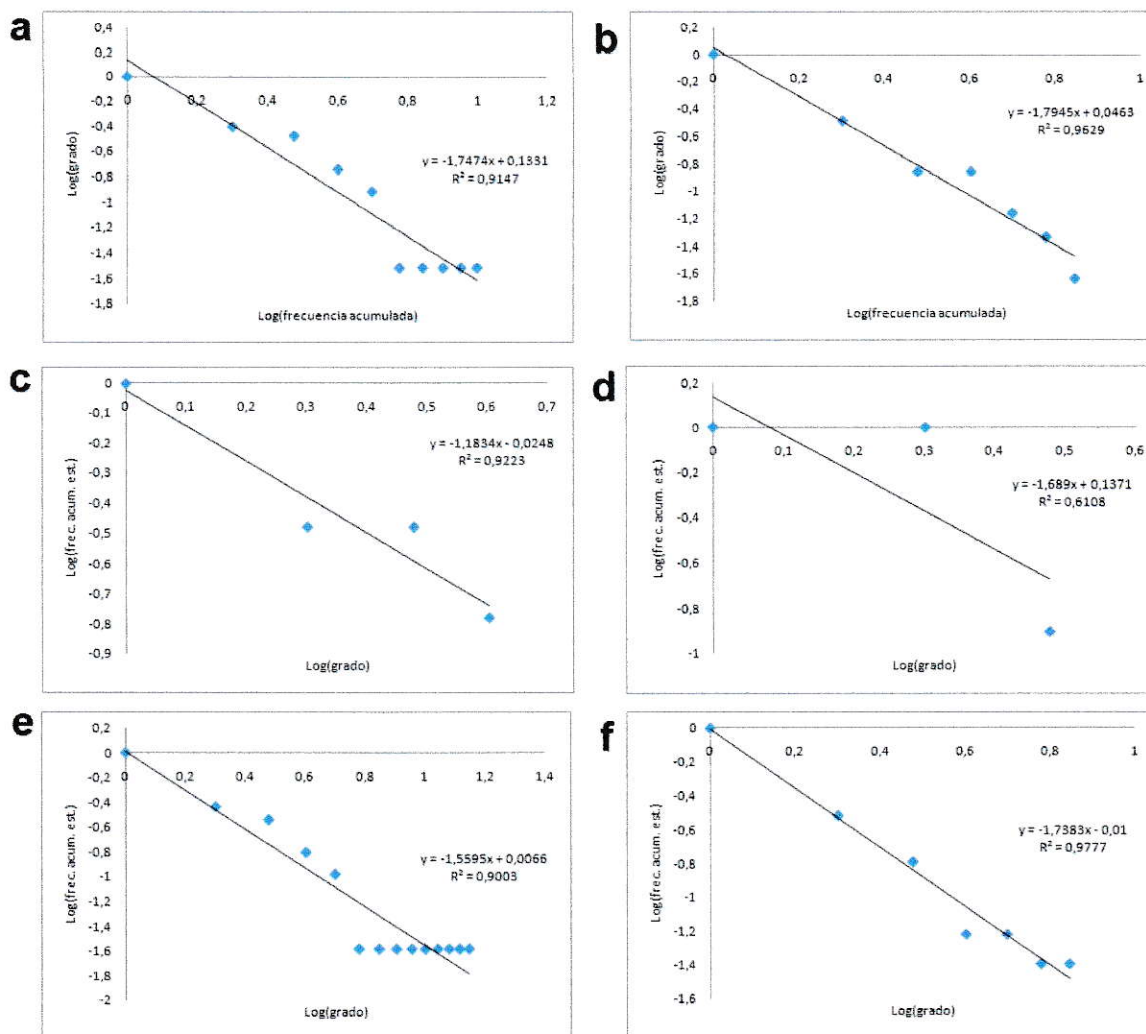


Figura 14: Gráfico logarítmico de las frecuencias acumuladas estandarizadas versus el grado obtenido desde la matriz de Pez. (a) activaciones (salidas, OUT), (b) activaciones (entradas, IN), (c) inhibiciones (salidas, OUT), (d) inhibiciones (entradas, IN) (e) interacciones (salidas, OUT), (f) interacciones (entradas, IN).

En general se puede decir que los R^2 son relativamente altos, sobre el 0,80 (Tabla 6). Sin embargo, en muchos casos (Mosca Completa Activación IN (Fig. 12b); Mosca Completa Inhibición IN (Fig. 12d); Pez Activación OUT (Fig. 14a); Mosca Completa Interacciones OUT/IN (Fig. 12e/f); Mosca Interacciones OUT/IN (Fig. 13e/f); Pez Activación OUT (Fig. 14a), Pez Interacciones OUT (Fig. 14e)) pareciera ser que el ajuste lineal no es el más adecuado. Pero, no es posible ser más preciso, pues para ello se requeriría un parámetro para evaluar el ajuste, el cual no se tiene, o bien, hacerlo mediante una prueba

estadística (Criterio de Akaike, por ejemplo) probar la bondad del ajuste según diferentes modelos. No obstante, el interés de esos gráficos es observar una tendencia general solamente.

Al comparar los histogramas construidos según las entradas (IN) y salidas (OUT), se encuentra que en las matrices de Mosca Completa Activación, Mosca Completa Inhibición, Mosca Inhibición y Pez Inhibición, el coeficiente de regresión obtenido al considerar solo las salidas (OUT) es mayor que la obtenida al considerar solo las entradas (IN). En las demás matrices se encuentra la situación opuesta.

En el gráfico correspondiente a Pez Activación (Fig. 14a) se encuentra que hay un nodo altamente conectado que se escapa a la tendencia mostrada por los otros nodos. Notar que hasta los nodos (genes) que tienen interacciones con 5 nodos (genes) se ve una tendencia lineal. Sin embargo, después no hay nodos (genes) que tengan un número de interacciones intermedios hasta el nodo (gen) muy conectado, el cual tiene 14 interacciones (ver archivo "Análisis de matrices.xls"). Este nodo representa al gen *shh*.

Si bien, en general los gráficos presentados poseen pocos puntos respecto al número de datos obtenidos de bases de datos de experimentos de doble híbrido. La matriz de Pez Inhibición posee muy pocos datos, incluso en comparación con las demás matrices construidas. Ello hace que sea poco representativa. Por el contrario las matrices llamadas Mosca/Mosca Completa/Pez-Interacciones poseen un mayor número de datos por lo que podrían considerarse más representativas.

Las pendientes de los gráficos (IN y OUT) generados a partir de las matrices de mosca (Mosca completa y Mosca) se compararon para ver si diferían significativamente. En los pares de gráficos correspondientes a las dos matrices de interacciones de mosca no se encontraron diferencias significativas (Tabla 7). Vale decir, la tendencia que muestra la distribución de grados respecto a las entradas y las salidas es la misma. O bien, la forma en la que cambian las frecuencias acumuladas respecto al grado es igual al considerar solo las activaciones o solo las inhibiciones. No se compararon las pendientes entre las matrices principales, debido a que existe un desbalance en el número de datos. Ello imposibilita aplicar el test estadístico.

Tabla 7: Análisis de covarianza para comparar la homogeneidad de las pendientes de los gráficos generados a partir de las matrices de interacciones totales.

Comparación: IN vs OUT	Grados de libertad	F	p
Mosca completa	1, 15	0,30296	0,590000
Mosca	1, 15	1,30529	0,271159

Finalmente y solo a modo descriptivo se calculó el promedio de interacciones por nodo en cada matriz (Tabla 8). Por la tendencia a la distribución de ley de potencia se puede explicar el hecho que el promedio de interacciones por nodo sea prácticamente en todos los casos igual o menor que su respectiva desviación estándar. Esto demuestra la variabilidad de los grados de los distintos nodos. Por la gran desviación estándar no es posible hacer mayores comparaciones entre las distintas matrices.

Tabla 8: Cálculo del promedio de interacciones por nodo en las diferentes matrices

Gráfico		Promedio	DS
Mosca Completa Activación	Salidas (OUT)	1,2	2,0
	Entradas (IN)		1,3
Mosca Completa Inhibición	Salidas (OUT)	1,1	1,3
	Entradas (IN)		1,6
Mosca Completa Interacciones	Salidas (OUT)	2,3	2,5
	Entradas (IN)		2,1
Mosca Activación	Salidas (OUT)	1,3	2,1
	Entradas (IN)		1,2
Mosca Inhibición	Salidas (OUT)	1,2	1,4
	Entradas (IN)		1,5
Mosca Interacciones	Salidas (OUT)	2,6	2,8
	Entradas (IN)		2,6
Pez Activación	Salidas (OUT)	1,2	1,8
	Entradas (IN)		1,4
Pez Inhibición	Salidas (OUT)	0,2	0,6
	Entradas (IN)		0,5
Pez Interacciones	Salidas (OUT)	1,3	2,1
	Entradas (IN)		1,4

5.- Genes candidatos a buscar

La construcción y posterior análisis de las redes de interacción génica implicadas en el desarrollo de extremidades produce como uno de sus resultados una serie de posibles genes candidatos a buscar a nivel de expresión. A continuación se plantearán los distintos argumentos que sustentan el examinar la expresión de ciertos genes que podrían encontrarse conservados en ambas especies. Dado que para efectuar el BLAST bidireccional se utilizaron genes implicados en el desarrollo de la pata de *Drosophila*,

lo que se presenta a continuación son argumentos para justificar la posible expresión de diversos genes en la aleta de pez cebra. Si bien la mayoría de ellos surge a partir del análisis bioinformático, existe una minoría que por diversas razones no fue considerado en este cotejo, pero de todos modos se encontraron suficientes razones para incluirlo como posibles candidatos.

En la presente sección se muestran los genes candidatos a buscar. Para cada uno se indica su nombre en *Drosophila* y en pez cebra (en el caso de existir más de un parálogo se ocupa un nombre genérico). Referente a la comparación de secuencias se señalan los parámetros de % Identidad, % Cobertura y Valor E. Además, se indican todos los genes que tienen efecto y sobre los que tiene efecto en la red de *Drosophila*. Para cada uno de estos genes se señala su respectivo ortólogo con expresión en la aleta de pez cebra, en el caso que exista. Se han incluido, solo a modo de referencia, aquellos posibles ortólogos aún no descritos en la aleta. Además, bajo el título de “OTROS ANTECEDENTES” se incluyeron evidencias experimentales encontradas en la literatura que podrían ser utilizados como argumentos a favor de la expresión de dicho gen en la aleta pectoral. Aquellos genes, junto con la información que los justificaba como posibles candidatos, cuya expresión no pudo ser verificada por hibridación *in situ* se encuentran descritos en el Apéndice III (Genes candidatos a buscar cuyos experimentos no fueron realizados).

5.1.- *bar*

NOMBRE DEL GEN EN PEZ CEBRA	<i>barh</i>
% IDENTIDAD	no analizado
% COBERTURA	no analizado
VALOR E	no analizado
CONSERVACIÓN DE INTERACCIONES	Los ortólogos de dos genes de <i>Drosophila</i> que tienen efecto sobre <i>bar</i> y cinco que son objetivos del mismo se expresan en la aleta del pez cebra (Tabla 9).

Tabla 9: Conservación de la red de interacciones de *bar*

Genes con efecto sobre <i>bar</i>		Genes objetivos de <i>bar</i>	
<i>Drosophila</i>	Pez cebra	<i>Drosophila</i>	Pez cebra
<i>lim1</i>	-	<i>lim1</i>	-
<i>dac</i>	<i>dach</i>	<i>EGFR</i>	<i>EGFR</i>
<i>bab</i>	-	<i>hth</i>	<i>meis</i>
<i>ap</i>	<i>lmx1b</i> y <i>lhx2</i>	<i>al</i>	<i>arx*</i>
<i>fasII</i>	-	<i>dll</i>	<i>dlx</i>
		<i>chip</i>	<i>lbd</i>
		<i>tgo</i>	<i>arnt</i>

*Su expresión no se ha probado, pero mediante el análisis bioinformático se encontró su presencia en el genoma de pez cebra o bien la literatura lo sugiere.

OTROS ANTECEDENTES: Análisis filogenéticos muestran que los dos parálogos presentes en el pez cebra, los cuales se encuentran relacionados con los genes *bar* en *Drosophila*. (Fig. 15) Colombo y col. (2006) muestran los patrones de expresión hasta las 48 hpf y no se encuentra marca en la aleta pectoral. Esta información es corroborada mediante una comunicación personal con Alicia Colombo (Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

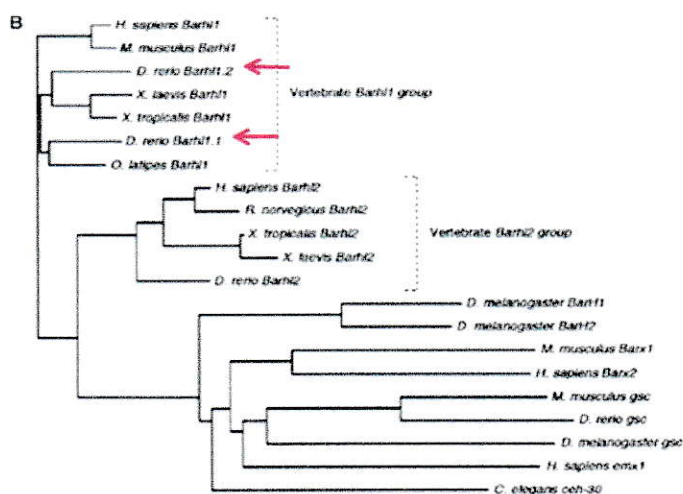


Figura 15: Cladograma correspondiente al gen *bar*. Las flechas rojas señalan los parálogos de *bar* presentes en pez cebra. Modificado de Reig y col., 2007.

PATRÓN DE EXPRESIÓN:

Para buscar el patrón de expresión de *barhl1.1* (*barh1*) y *barhl1.2* (*barh3*) se utilizó el protocolo tradicional de hibridación *in situ*. Solo se trabajó con embriones de 72 hpf, pues en estadios previos ya había sido comprobada la ausencia de expresión en la aleta pectoral.

El patrón de expresión encontrado en *barhl1.1* (Fig. 16a) corresponde a una marca en forma de línea que limita con la parte posterior del ojo. Esta marca se inicia cerca del oído y se extiende hasta el ojo, llegando al mismo de manera perpendicular. Luego, se expande un poco hacia dorsal siguiendo el contorno del borde del ojo. Además, separado de la primera marca descrita, en el borde dorsal del ojo arriba del cristalino hay otra marca en forma de punto. Por otro lado, en la zona en la que debiese ubicarse la aleta pectoral se ve un ensombrecimiento, el cual esta acentuado en la zona más anterior. Resulta difícil discernir si es marca o un artefacto de la preparación.

Para *barhl1.2* (Fig. 16b) se encuentran dos dominios de expresión adyacentes, ambos con forma de línea. El primero, ubicado a una altura un poco más dorsal que la notocorda, se extiende desde el comienzo de los somitos hasta poco antes del ojo. El segundo comienza un poco más hacia rostral y bordea tangencialmente por fuera el ojo hasta su zona más dorsal.

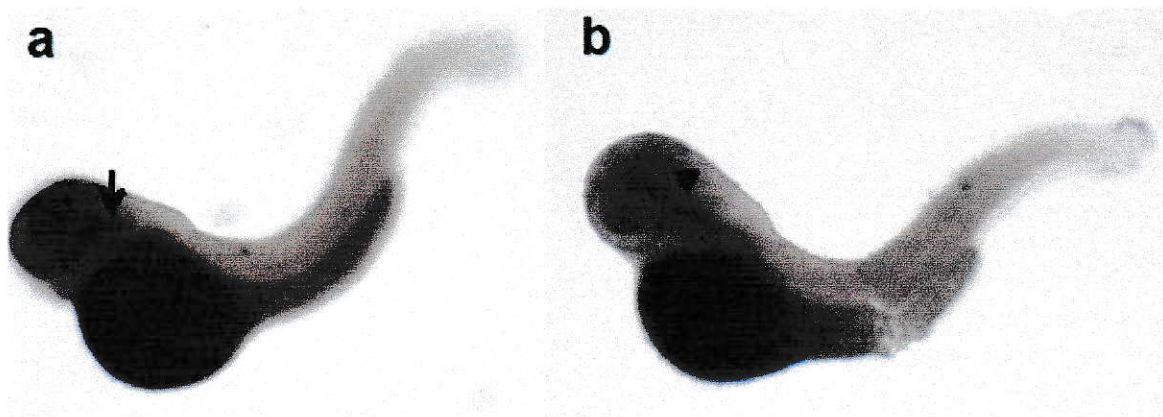


Figura 16: Hibridación *in situ* de *barhl1.1* (*barh1*) y *barhl1.2* (*barh3*). Embriones de 72 hpf. (a) Vista lateral de hibridación *in situ* de *barhl1.1* (*barh1*). Se observa marca en la región posterior al ojo (flecha) y un punto en la región dorsal/central de la retina. (b) Vista lateral de hibridación *in situ* de *barhl1.2* (*barh3*). Se observa marca en la región posterior al ojo (cabeza de flecha), la cual se extiende, en una segunda región, tangencialmente hasta la zona que se ubica dorsal al mismo.

5.2.- *saxophone (sax)*

NOMBRE DEL GEN EN PEZ CEBRA	<i>alk8</i>
% IDENTIDAD	57
% COBERTURA	87
VALOR E	3,00E-144
CONSERVACIÓN DE INTERACCIONES	No se encuentra incluido en la red del desarrollo de la pata de <i>Drosophila</i> .

OTROS ANTECEDENTES: *sax* codifica para un receptor de *dpp* tipo I. Experimentos de dominante negativo han demostrado que *dpp* no es un ligando relevante, en condiciones fisiológicas, de *sax*. Sin embargo, se ha descrito que intensifica la señal intracelular transmitida por el receptor *tkv* (revisado por Raftery y Sutherland, 1999).

Los ortólogos de *dpp*, es decir *bmp2b* y *bmp4*, si se expresan en la aleta de pez cebra. Existe una línea mutante de *alk8* en pez cebra ella es llamado *lost-a-fin (laf)*. Como parte del fenotipo se encuentran embriones dorsalizados y pérdida aleta caudal ventral. No se ha observado la aleta pectoral larval (van Eeden, 1996). Además, análisis filogenéticos de las familias de receptores tipo I y tipo II agrupan juntos a *alk8* y *sax* dentro de los receptores de activina tipo I (Fig. 17). Por otro lado, en la base de datos ZFIN se encontró una sugerente fotografía de las hibridaciones *in situ* masivas desarrolladas por Thisse y Thisse. (2004) (Fig. 18). En varios embriones mostrados se logra reconocer una marca en la zona donde se encuentra la aleta pectoral. No se especifica el estadio.

PATRÓN DE EXPRESIÓN:

El patrón de expresión de *alk8* fue reportado mediante dos protocolos de hibridación *in situ* diferentes. En ambos casos se buscó la expresión en embriones de 24 hpf y 48 hpf. A las 24 hpf ninguno de los dos protocolos reveló ningún tipo de marca. Dado que existen diferencias en algunos aspectos de los patrones de expresión se expondrán ambos resultados por separado.

Utilizando el protocolo indicado en Materiales y Métodos, se encontró una marca a lo largo de toda la notocorda y el oído (Fig. 19a). Esta última marca se encuentra bilateralmente (Fig. 19b). Este patrón presenta una alta reproductibilidad y se observa idéntico en la gran mayoría de los embriones.

Al trabajar con el protocolo desarrollado por Fuentes y Fernández, 2009 (*comunicación personal*) la hibridación realizada con la sonda 2x presenta una leve marca en la aleta pectoral y no se observa marca en la notocorda o el oído (Fig. 19c, d). Se logró aislar una de estas aletas y se evidenció que presenta un marca homogénea con una leve mayor intensidad en la región distal y central/proximal (Fig. 19f). Al utilizar la sonda a concentración 4x se observa que la marca presente en la notocorda junto con una en la aleta pectoral. Además, se observa marca en todo el cerebro sin poder distinguirse regiones particulares.

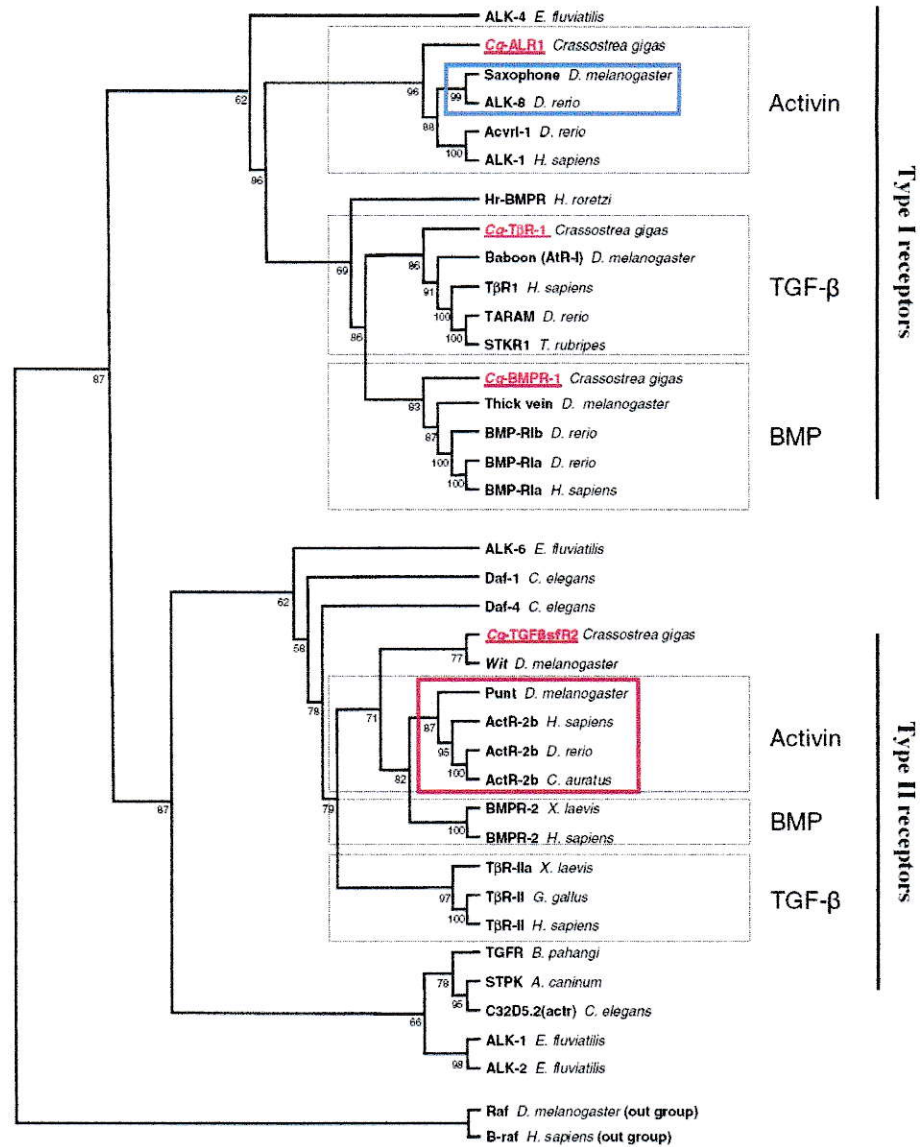


Figura 17: Cladograma correspondiente a las familias de receptores Tipo I y Tipo II. En el rectángulo azul se muestra el clado en el que agrupa *sax* (*D. melanogaster*) y *alk8* (*D. rerio*). En el rectángulo rojo se muestra el clado en el que agrupa a *punt* (*D. melanogaster*) y los *actr2b* de *H. sapiens*, *C. auratus* y *D. rerio*. Modificado de Herpin y col. (2005).

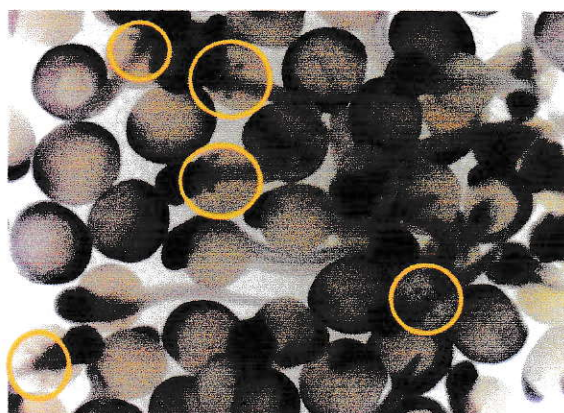
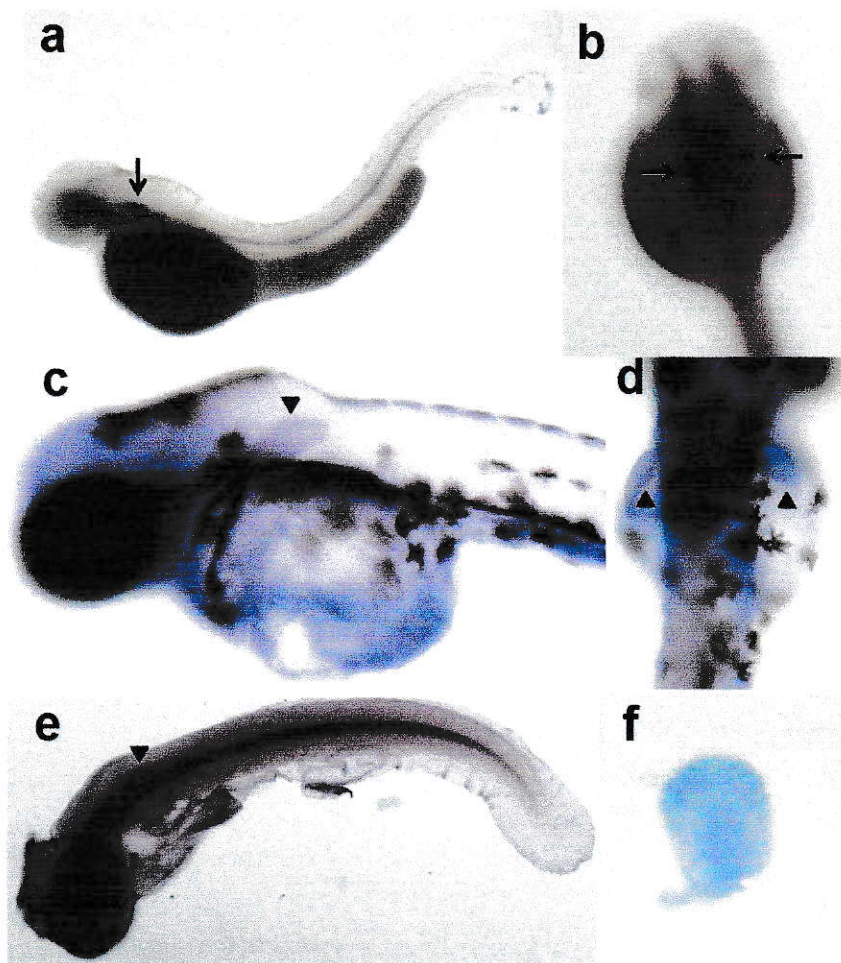


Figura 18: Hibridación *in situ* masiva (Thisse y Thisse, 2004) de *alk8*. Enmarcados en círculos amarillos se muestran los embriones que presentan marca de *alk8* en las aletas pectorales. En la foto se presentan embriones de diversos estadios. Modificado de (Thisse y Thisse, 2004).



<Figura 19: Híbridaciones *in situ* de *alk8*. Embriones de 48 hpf. Las fotos (a) y (b) corresponden al método tradicional. Las fotos (c), (d), (e) y (f) corresponden al método comunicado por Fuentes y Fernández (2009). En los experimentos representados por las fotos (a), (b) y (e) se utilizó la sonda 4x; en los de las fotos (c), (d) y (f) se ocupó 2x. (a) Vista lateral. Se observa marca en el oído (flecha) y la notocorda. (b) Vista dorsal. Se observa marca en ambos oídos (flechas). (c) Vista lateral. Se observa una leve marca en la aleta pectoral (cabeza de flecha). (d) Vista dorsal. Se observa una leve marca en la aleta pectoral (cabeza de flecha). (e) Vista lateral. Se observa marca en cerebro, notocorda y aleta pectoral (cabeza de flecha). El vitelo se degradó por efecto del tratamiento. (f) Aleta pectoral aislada de embrión correspondiente a imágenes (c) y (d). Se observa marca homogénea con una leve mayor intensidad en la región distal y central/proximal.

5.3.- *punt*

NOMBRE DEL GEN EN PEZ CEBRA	<i>actr11b</i> o <i>acvr2b</i>
% IDENTIDAD	46
% COBERTURA	91
VALOR E	1,00E-109
CONSERVACIÓN DE INTERACCIONES	El ortólogo de un gen de <i>Drosophila</i> que tiene efecto sobre <i>punt</i> se expresa en la aleta del pez cebra (Tabla 10).

Tabla 10: Conservación de la red de interacciones *punt*

Genes con efecto sobre <i>punt</i>		Genes objetivos de <i>punt</i>	
<i>Drosophila</i>	Pez cebra	<i>Drosophila</i>	Pez cebra
<i>dpp</i>	<i>bmp2/4</i>	<i>mad</i>	<i>smad1</i> *

*Su expresión no se ha probado, pero mediante el análisis bioinformático se encontró su presencia en el genoma de pez cebra o bien la literatura lo sugiere.

OTROS ANTECEDENTES: *punt* corresponde a un gen cuya expresión no ha sido reportada efectivamente en el disco imaginal de pata, sin embargo fue incluido en la red en calidad de “muy probable expresión”. Esto debido a que se ha descrito que cuando actúa en conjunto con *tkv* o *sax* las células responden ante *dpp* (Penton y Hoffmann, 1996). Además, la presencia de líneas clonales carentes de expresión de *punt* en el disco imaginal de pata tiene efectos fenotípicos, ello sugiere que parte de los miembros de la cascada en la que se encuentra implicado *punt* se encuentran en esta estructura. Cuando los clones se expresan en la zona ventral o lateral no tienen efectos en la pata adulta. Mientras que cuando la expresión se induce en la región dorsal, genera bifurcaciones en la pata adulta y duplicaciones de los peines sexuales en los machos (Penton y Hoffmann, 1996). Respecto a pez cebra, se ha propuesto que *actr11b* tendría un rol de receptor tipo II para *bmp2/4* en vertebrados (Nagaso y col., 1999). Finalmente, análisis filogenéticos de las familias de receptores tipo I y tipo II agrupan juntos a *actr11b* y *punt* dentro de los receptores de activina tipo II (Fig. 17).

PATRÓN DE EXPRESIÓN:

Debido a que se pudo conseguir la sonda para los dos parálogos, *actrIIa* y *actrIIb*, se realizaron ambas hibridaciones *in situ*, pese a que el interés original era solo en *actrIIb*.

+ *actrIIb*

El patrón de expresión de *actrIIb* se estudió a las 24 hpf y 48 hpf. Sin embargo, solamente en el último tiempo se detectó su expresión. Para facilitar la observación se retiró manualmente el vitelo. El patrón de expresión corresponde a una conspicua marca en la aleta pectoral y en el borde de la cola (Fig. 20a, b, c). La imagen dorsal del embrión (Fig. 20b) sugiere que la marca se encontraría principalmente en el borde de la aleta en la región correspondiente al AER. La segunda se ubica en el borde posterior del cuerpo (Fig. 20a, d). Se aprecia tanto en la zona dorsal como ventral y es más intensa en la cola. A lo largo de la notocorda también se puede observar una muy sutil señal. El vitelo, en tanto, se marca intensamente, por ello fue retirado.

+ *actrIIa*

El patrón de expresión de *actrIIa* se estudió a las 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. A las 24 hpf se encuentra una marca que se extiende en todo el sistema nervioso central. Desde el cerebro anterior hasta el cerebro posterior, luego continuándose en la notocorda. La marca incluso permite identificar claramente donde comienzan los rombómeros. No se encuentran otras marcas (Fig. 21a). En los embriones de 48 hpf se observa una marca en la notocorda y otra en forma de línea en la zona posterior al ojo. Notar que en ambos estadíos el vitelo no se tiñe (Fig. 21b). Finalmente, en los embriones de 72 hpf se encuentra una marca con forma de línea desde la zona del oído hasta la región que limita con el borde superior del ojo. La notocorda también se tiñe un poco. Además, a diferencia de los otros dos estadíos se observa marca de fondo y el vitelo se tiñe, La presencia de marca de fondo particularmente en este estadio se observó en las dos repeticiones que se realizaron de la hibridación *in situ* (Fig. 21c).

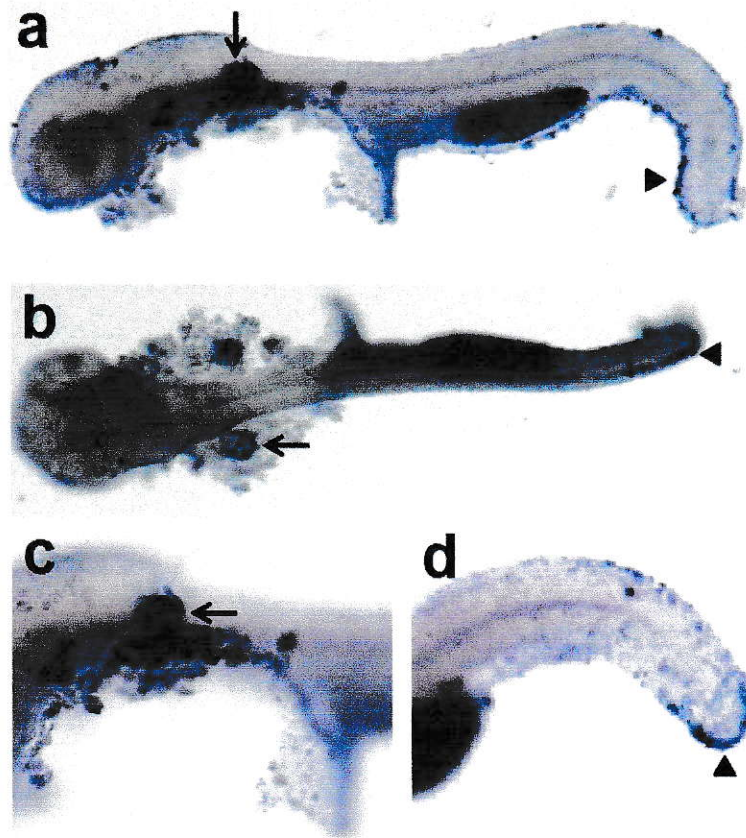


Figura 20: Hibridación *in situ* de *actr11b*. Embriones sin vitelo de 48 hpf. (a) Vista lateral. Se observa marca en la aleta pectoral (flecha) y en el borde de la cola (cabeza de flecha). (b) Vista dorsal. Se observa la marca en las aletas pectorales (flecha) y en el borde superior de la cola (cabeza de flecha). (c) Vista lateral. Acercamiento de la aleta pectoral (flecha). (d) Vista lateral. Acercamiento de la cola (cabeza de flecha).

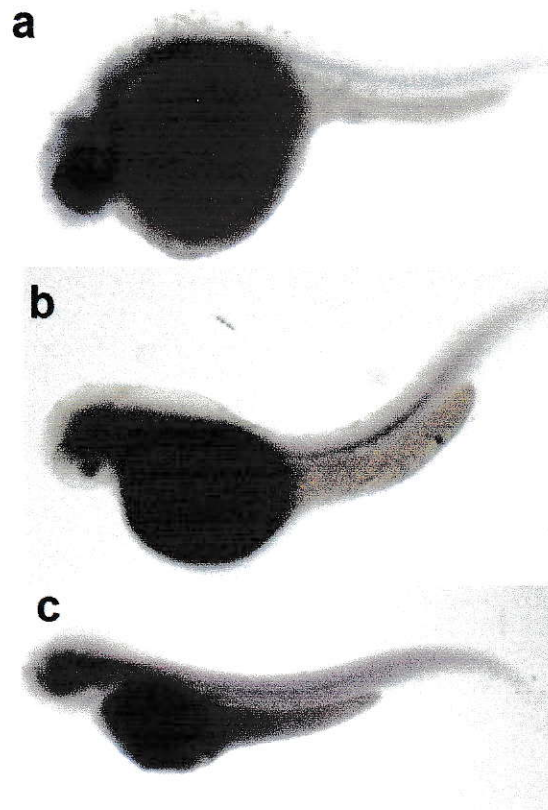


Figura 21: Hibridación in situ de *actrIIa*. (a) Vista lateral de embrión de 24 hpf. Se observa marca en todo el sistema nervioso central. (b) Vista lateral de embrión de 48 hpf. Se observa marca en forma de línea en la zona posterior al ojo y en la notocorda. (c) Vista lateral de embrión de 72 hpf. Se observa marca en forma de línea en la zona posterior al ojo, la cual se prolonga por sobre el mismo. Además, hay más marca de fondo que en los otros estadios.

5.4.- *frizzled (fz/fz2)*

NOMBRE DEL GEN EN PEZ CEBRA	<i>frizzled8a (fz8a)</i>
% IDENTIDAD	55
% COBERTURA	81
VALOR E	2,00E-169
CONSERVACIÓN DE INTERACCIONES	El ortólogo de un gen de <i>Drosophila</i> que tienen efecto sobre <i>fz/fz2</i> se expresa en la aleta del pez cebra (Tabla 11).

Tabla 11: Conservación de la red de interacciones *fz/fz2*

Genes con efecto sobre <i>fz/fz2</i>		Genes objetivos de <i>fz/fz2</i>	
<i>Drosophila</i>	Pez cebra	<i>Drosophila</i>	Pez cebra
<i>wg</i>	<i>wnt3a</i>	<i>dsh</i>	<i>dvl2*</i>

*Su expresión no se ha probado, pero mediante el análisis bioinformático se encontró su presencia en el genoma de pez cebra o bien la literatura lo sugiere.

OTROS ANTECEDENTES: En la base de datos ZFIN se ha descrito el patrón de expresión desde las 19 hpf hasta las 72 hpf y no se reporta marca en la aleta pectoral (Thisse y Thisse, 2004).

PATRÓN DE EXPRESIÓN:

El patrón de expresión de *fz8a* fue verificado para embriones de 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. No se encontró un patrón significativo en los primeros dos estadios. A las 72 hpf se ve solo una marca muy tenue en la notocorda, en la zona posterior al ojo y aparentemente en el borde posterior de la cola (Fig. 22).



Figura 22: Hibridación *in situ* de *fz8a*. Vista lateral de embrión de 72 hpf. Se ve una marca muy tenue en la notocorda y en la zona posterior al ojo.

5.5.- *tick-veins* (*tkv*)

NOMBRE DEL GEN EN PEZ CEBRA	<i>bmpr1a</i>
% IDENTIDAD	51
% COBERTURA	86
VALOR E	8,00E-130
CONSERVACIÓN DE INTERACCIONES	El ortólogo de un gen de <i>Drosophila</i> que tiene efecto sobre <i>tkv</i> se expresa en la aleta del pez cebra (Tabla 12).

Tabla 12: Conservación de la red de interacciones de *tkv*

Genes con efecto sobre <i>tkv</i>		Genes objetivos de <i>tkv</i>	
<i>Drosophila</i>	Pez cebra	<i>Drosophila</i>	Pez cebra
<i>dpp</i>	<i>bmp2-4</i>	<i>mad</i>	<i>smad*</i>

*Su expresión no se ha probado, pero mediante el análisis bioinformático se encontró su presencia en el genoma de pez cebra o bien la literatura lo sugiere.

OTROS ANTECEDENTES: En la extremidad de ratón se ha descrito que β -catenina actúa río debajo de *bmpr1a* en la formación de AER (Soshnikova y col., 2003). En ratones mutantes condicionales de *bmpr1a* existen problemas en la formación del AER y alteraciones en el patrón D/V (Guha y col., 2002).

PATRÓN DE EXPRESIÓN:

El patrón de expresión de *bmpr1a* fue verificado para embriones de 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. En el primer estadio revisado no se encontró ningún tipo de marca. Ni siquiera, marca de fondo. En cambio, en los embriones de 48 hpf se encuentra una intensa marca en el oído. Esta marca tiene forma de punto y se presenta bilateralmente. De manera muy tenue se tiñe la notocorda (Fig. 23a). Además, en las vistas dorsales se puede identificar otro sitio de expresión sobre la línea media en la zona central/posterior del cerebro (Fig. 23b). Probablemente corresponde a la zona adyacente al ventrículo del cerebro posterior. No hay presencia de marca de fondo ni tampoco se tiñe el vitelo. En los embriones de 72 hpf no se observa ninguna marca de gran intensidad. En la zona que está directamente atrás de la región ventral posterior del ojo, al igual que en la notocorda se observa una muy débil marca (Fig. 23c).

7.- Evidencias de la activación de una vía de señalización

+ Expresión de pSmad

Para comprobar la presencia de la forma fosforilada de Smad (pSmad) se realizó una inmunohistoquímica a embriones de 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. En los tres casos la tinción fue revelada con DAB. Adicionalmente, se repitió el procedimiento con embriones de 48 hpf, pero esta vez se reveló con un anticuerpo fluorescente.

Primero me referiré a los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica revelada con DAB. En los embriones de 24 hpf no se encontró ninguna marca significativa. Situación diferente sucede con los embriones de 48 hpf. En ellos se observa una intensa marca en las aletas pectorales (Fig. 24a). En las vistas dorsales (Fig. 24c) y sagitales (Fig. 24d) se puede apreciar además, que esta marca es más intensa en los bordes de la aleta que en su centro. Además, se ve marca en el sistema nervioso central. Particularmente, ella es intensa en los márgenes del cerebro posterior y en la región entre los hemisferios del cerebro medio (Fig. 24b, d). En los embriones de 72 hpf resultó muy difícil completar el tratamiento sin que se dañaran o destruyeran las aletas. Los pocos embriones con los que se pudo finalizar el protocolo no se encuentra una marca significativa en la aleta o en cualquier otra estructura.

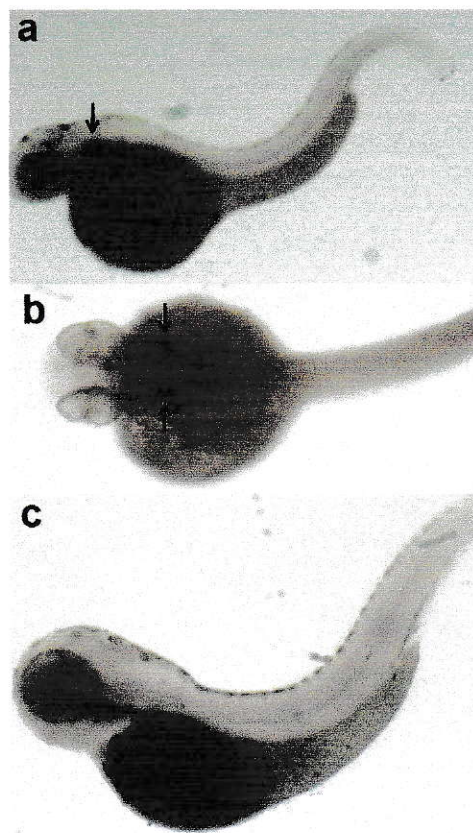


Figura 23: Hibridación *in situ* de *bmpr1a*. (a) Vista lateral de embrión de 48 hpf. Se observa marca en el oído (flecha) y muy tenue en la notocorda. (b) Vista dorsal de embrión de 48 hpf. Se observa marca el oído (flechas). (c) Vista lateral de embrión de 72 hpf. Se observa marca muy tenue en la notocorda y en la zona posterior/ventral al ojo.

Por otro lado, al revelar la inmunohistoquímica con un anticuerpo fluorescente resultó muy difícil encontrar fluorescencia notoriamente más intensa que la marca de fondo en la aleta. Con una serie de cortes confocales (ver Cortes.lsm) se efectuó una reconstrucción 3D de la estructura (ver Animación3D.lsm). En la figura 25, se puede apreciar la presencia de pSmad (verde) en la región distal de la aleta. Ella resulta consistente con lo observado al revelar la inmunohistoquímica con DAB. En esta prueba no se observó lo que sucedía en el sistema nervioso central.



Figura 24: Inmunohistoquímica de pSmad revelada con DAB. Embriones de 48 hpf. (a) Vista lateral. Se observa marca en la aleta pectoral y muy levemente en el borde superior del cerebro posterior. (b) Vista dorsal. Se observa una intensa marca en todo el borde del cerebro posterior (flecha negra) y en la región entre los hemisferios del cerebro medio (flecha blanca). (c) Vista dorsal. La misma foto mostrada en (b) con el foco de la imagen a nivel de las aletas pectorales (cabeza de flecha), las cuales presentan una intensa marca. (d) Vista sagital. Se observa la marca en las aletas pectorales y en el borde del cerebro posterior.

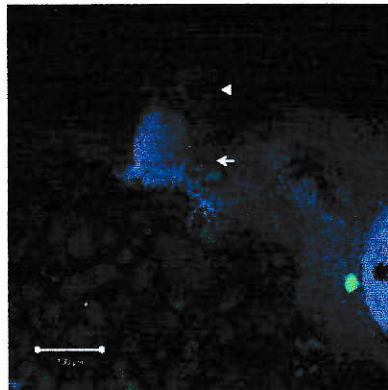


Figura 25: Inmunohistoquímica de pSmad revelada con anticuerpo secundario fluorescente. Embrión de 48 hpf. Imagen integrada de todos los cortes confocales (ver Integrada.lsm). La foto muestra un vista lateral la presencia de pSmad en las células distales de la aleta pectoral (cabeza de flecha). En la zona anterior/proximal se ven dos granos de vitelo (flecha). En la zona inferior derecha se encuentra una marca intensa de núcleos celulares, ella corresponde al ojo (asterisco). En verde la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario, en azul la fluorescencia emitida por ToPro3, el cual tiñe los núcleos celulares. Barra: 100 μ m

DISCUSIÓN

“We suggest that this pre-Cambrian ancestor of most protostomes and the deuterostomes possessed elements of genetic machinery for and may have even borne appendages”

Panganiban G, Irvine SM, Lowe C, Roehl H, Corley LS, Sherbon B, Grenier JK, Fallon JF, Kimble J, Walker M, Wray GA, Swalla BJ, Martindale MQ, y Carroll SB
-1997-

La idea de Darwin de la “descendencia con modificación” corresponde a un eje central dentro de la teoría evolutiva. Implícitamente al aceptar este postulado se acepta el hecho de que efectivamente existe una ancestría común de todos los organismos.

En base a muchas evidencias, entre ellas la presencia de homologías, Darwin infirió la existencia de los ancestros comunes. Hoy se acepta la evolución y la existencia de ancestros comunes como un hecho para explicar la presencia de rasgos conservados (genes, por ejemplo). Lo que hace 150 años era evaluado como una hipótesis, hoy se considera un paradigma. Éste se utiliza para justificar la conservación de diferentes rasgos, en lugar de utilizar los mismos como evidencias de la evolución.

Actualmente, se busca explorar qué es lo que se conserva y de qué manera. Con especial referencia a esto último el paleontólogo norteamericano George G. Simpson, en su libro “Tempo and mode in evolution” (1944), se refiere a cómo los mecanismos que operan a nivel microevolutivo podrían explicar los patrones macroevolutivos. Por microevolución se entiende a todos los procesos de diversificación que ocurren a una escala ecológica de tiempo. Vale decir en miles o cientos de años. Se asocia a divergencias entre poblaciones de una misma especie. Clásicamente se han definido cuatro fuerzas microevolutivas (factores que cambian las frecuencias alélicas en las poblaciones). Ellas son: deriva génica, selección natural, migraciones y mutaciones.

En tanto, el término macroevolución se ha reservado para los cambios que ocurren sobre el nivel taxonómico de especie y a escalas temporales que pueden alcanzar hasta los cientos de millones de años. Aquí se hace alusión a fenómenos de extinción masiva o cambios evolutivos que corresponden a sinapomorfías propias de grupos taxonómicos superiores. Se puede mencionar el origen del pelo o la

aparición de las flores. No obstante, esta separación conceptual no es consensuada en la comunidad científica. Existen algunos que, al igual que Simpson, postulan que existe una independencia en la escala temporal a la que se ve el cambio evolutivo (Leroi, 2000), sin embargo otros postulan que existen mecanismos diferentes en micro y macroevolución (Erwin, 2000).

Desde hace siglos, estudios de embriología han servido para comprender procesos de diversificación que involucran los grandes grupos zoológicos. Un clásico ejemplo de esto corresponde a la ley biogenética de Ernst Haeckel, “la ontogenia recapitula la filogenia” (1892), la cual se refiere a como en los estadios más tempranos de desarrollo existen mayores similitudes entre los distintos vertebrados, mientras que las diferencias aparecen más tardíamente. De esta manera sucedería una “recapitulación” de la filogenia durante el desarrollo fetal. No obstante, años después esta máxima sería refraseada por Walter Garnstag, “la ontogenia no recapitula la filogenia, la crea” (1922). Además, conceptos como “pedomorfosis”, “heterocronía” e incluso “homología” fueron ampliamente desarrollados en el campo de la embriología por Sir Gavin De Beer (Hall, 2000).

Actualmente, se ha reemplazado el término “embriología” por “biología del desarrollo”. Asociado a esto hay una serie de nuevas aproximaciones al estudio del desarrollo. Muchas de ellas son técnicas (biología molecular, bioinformática, entre otras) y/o nuevas preguntas (vías de señalización, roles de genes particulares, estudio de mutantes, etc). En tanto, todos los estudios evolutivos del desarrollo se han agrupado bajo el nombre de “EvoDevo” (del inglés, Evolution & Development) (Raff y col., 1999).

Una de las formas en las que se desarrolla la investigación en el “EvoDevo” consiste en explicar mecánicamente patrones de cambio morfológico encontrados en el registro fósil (Raff, 2007). Sin embargo, evidencia del desarrollo también puede llevar a suponer la existencia de organismos ancestrales. Este es el caso de *Urbilateria* (De Robertis y Sasai, 1996).

En este trabajo de tesis se buscó estudiar un rasgo particular de este ancestro hipotético, sus apéndices. Para ello se ha comparado la red de interacciones génicas asociadas a la formación de los mismos en artrópodos (*D. melanogaster*) y vertebrados (*D. rerio*). Además, se realizaron experimentos para corroborar predicciones realizadas a partir de la construcción de las redes.

1.- Construcción de las redes de interacción génica

1.1.- Modelos utilizados

Utilizando la gran cantidad de información disponible se construyeron 2 redes de interacción génica. Una asociada al desarrollo de la pata de *Drosophila* y la otra a la aleta pectoral de pez cebra. Si bien la elección de los organismos a estudiar se basó en la disponibilidad de información y su respectiva ubicación en la filogenia. Es necesario considerar que por tratarse de solo dos organismos parte de las conclusiones pueden encontrarse sesgadas por rasgos derivados.

Así resulta inevitable mencionar que el modo de desarrollo que posee *Drosophila* corresponde a una particularidad entre los insectos (revisado por Moczek, 2006). Además, el primer fósil perteneciente al orden se encuentra recién en el Triásico superior hace 225 millones de años (Tree of Life web site). Por lo tanto, corresponde a un grupo relativamente derivado. Considerando solo el subphylum Insecta, el organismo ideal a estudiar podría haber correspondido a un Archeognatha. Este es el grupo hermano del clado formado por los Thysanura (pececillos de plata) y Pterigotos (insectos con alas). Su registro fósil más antiguo corresponde al Devónico temprano (390 millones de años) en Québec, Canadá (Labandeira y col., 1988). Además, los Archeognatha retienen rasgos muy basales como apéndices abdominales, los cuales podrían corresponder a remanentes ancestrales de extremidades (Tree of Life web site).

En tanto, un pez ideal para realizar el estudio habría correspondido a un condriectio. Las escamas más antiguas asociadas a un putativo condriectio son del Ordovícico tardío (455 millones de años) en Colorado (EE.UU) (Sansom y col., 1996). Mientras que el fósil articulado más antiguo conocido es *Doliodus problematicus* (Devónico temprano, 419 millones de años), el cual presenta por primera vez aletas/espinas pectorales. De hecho, actualmente se está realizando investigación asociada al origen de las extremidades en varias especies de condriectios (*Leucoraja erinaceae* y *Scyliorhinus canicula*) (Nicholas y Currie, 2007; Gillis y col., 2009).

Pese a lo anterior, resulta indudable que la gran cantidad de información y herramientas asociadas al estudio de *D. melanogaster* y *D. rerio*, los convierten, en un sentido práctico, en los mejores modelos

para responder este tipo de preguntas. De hecho, la información generada a partir de esta comparación puede servir como una “guía heurística” para futuras investigaciones en grupos más basales.

1.2.- Forma de construir la red

Las redes génicas construidas se relacionan a la constitución de una estructura macroscópica en la que están involucrados muchos grupos celulares. En una situación ideal sería esperable que la red génica diera cuenta de dichos procesos de diferenciación fina. Sin embargo, esto se escapa del interés por el cual fue construida la red y para lograrlo se requeriría mucha más información que la disponible. La red fue construida para comparar el establecimiento de los ejes y los procesos de crecimiento temprano. En estos estadios dichas estructuras no presenta una diferenciación celular tan compleja como en los momentos más tardíos. Por ello es posible hacer esta aproximación (la red).

Por otro lado, al momento de construir la red se siguieron ciertas “reglas” para mantener una homogeneidad de criterios en la forma de procesar la información. Esto permitió condensar gran cantidad de información, sin embargo se perdieron muchos detalles propios del fenómeno. Así, por ejemplo, en la red se catalogan como inhibiciones fenómenos tan diferentes como proteólisis, represión de la transcripción, secuestro de proteínas en un complejo, etc. Algo similar ocurre con las activaciones. Las consecuencias que esto puede tener en la comparación se relacionen con una sobre simplificación de las interacciones observadas y con ello la posibilidad de llegar a conclusiones incompletas o sesgadas.

Relacionado con estas “reglas” se encuentra el hecho de que no se consideró incluir a procesos como un tipo de nodos dentro de la red, de esta manera las interacciones fueron directamente entre los distintos genes. Esto resulta muy importante al momento de evaluar parámetros de la red como la conectancia. En primer lugar, al no incluir procesos como un nodo, se genera una red de tipo unipartita. Esto significa que todos sus nodos son equivalentes. Además, esta decisión tiene consecuencias al momento de evaluar la conectividad. En la Fig. 7a se muestra un ejemplo en el que varias proteínas (A, B, C, D y E) forman un complejo que mediante la proteólisis de otra proteína (X) la inhiben. Se optó por representarlo como una inhibición de cada una sobre X. Sin embargo, podría haberse dibujado de manera que todas las proteínas implicadas en el complejo de proteólisis se agrupan en un nodo que representa al proceso y este último nodo sea el que ejerce la inhibición. Notar que en el primer caso tiene solamente

cinco entradas (IN), mientras que en el segundo, solo una. Debido a que el interés se relacionaba con las interacciones génicas se dio preferencia a la última forma de representación descrita.

Una cuarta observación en la que es necesario insistir se refiere a la dependencia del conocimiento actual. Usualmente el estudio de un organismo se realiza en base a lo que se conoce otro. Por tanto es esperable que muchos de los genes estudiados en *Drosophila* posteriormente sean investigados en el pez cebra. Esta dinámica hace muy posible que el porcentaje de los genes conservados encontrados (60%) esté sobre representado respecto al total real. Esta “falta de muestreo” también es un problema presente en las redes de polinización o tróficas descritas en la ecología (comunicación personal Profesor Rodrigo Ramos).

Directamente vinculado con lo anterior se encuentran las limitaciones asociadas a que es posible y que no, respecto de las redes construidas. Una aproximación que ha sido descrita por Stuart Kauffman (2008) consiste en tratar de simular la dinámica de la red mediante redes booleanas. Esta metodología no fue explorada mayormente, debido a la gran cantidad de aproximaciones efectuadas al momento de construir la red. Entre las que podrían tener una mayor influencia al momento de hacer una simulación se encuentran la falta de información referente a: (i) intermediarios en las interacciones, (ii) el tiempo que las distintas proteínas están activas, (iii) datos cuantitativos de los niveles de expresión (gradientes morfogénicos) y (iv) cuales son los genes con mayor relevancia en la activación o inhibición de otros genes. Además, sería necesario tener claridad sobre la sucesión temporal exacta de las distintas interacciones. Por todo lo anterior, los análisis que se hicieron se relacionaron con describir la forma en la que se daban las conexiones. Así el grafo generado podría clasificarse como un “proto-modelo” o un esquema para buscar semejanzas y diferencias, entre las redes.

2.- Comparación de las redes

2.1.- ¿Qué comparar y qué considerar?

En la introducción fue descrita la base morfológica asociada al desarrollo de la pata de *Drosophila* y la aleta del pez cebra. Existe una gran cantidad de diferencias. La primera de ellas corresponde al tipo de desarrollo que cada uno de estos animales tiene. En el caso de la mosca hay un

desarrollo holometábolo que pasa por diversos estadios larvarios. Asociado a estas mudas y el paso por una pupa surge la pata. En el pez existe un desarrollo directo y pese a que la aleta larval no es exactamente la que presentará el adulto las modificaciones morfológicas no son tan profundas como en el otro caso (Grandel y Schulte-Merker, 1998). Por otro lado, en el desarrollo de la aleta sucede una serie de interacciones inductivas entre ectoderma y mesoderma. Además, de jugar un rol importante moléculas originadas en el mesodermo somítico, placa lateral del mesodermo y mesodermo intermedio. En *Drosophila*, resulta imposible identificar ninguno de estos tejidos, pues ellos son característicos de los vertebrados. Además, la forma en la que se da el establecimiento de patrones en la pata de la mosca es diferente a como sucede en la aleta del pez. La presencia de un disco imaginal plano hace que aquello que es central en el disco sea distal en la pata y lo que es periférico proximal. Respecto a la disposición relativa de los ejes A/P y D/V no hay tantas diferencias.

Dadas estas profundas diferencias resulta muy difícil comparar el desarrollo de ambas estructuras. A diferencia de lo que sucede cuando se comparan las extremidades de peces con tetrápodos o los distintos tipos de patas en insectos. Por ello resulta comprensible que clásicamente sean consideradas convergencias sin ningún tipo de ancestría común.

No obstante, existe un aspecto en el desarrollo de ambas estructuras en el cual se han encontrado mayores similitudes (Tabin y col., 1999). Este corresponde a los genes implicados en la formación de patrones y otros factores de transcripción. En este aspecto la sola expresión de un gen resulta poco informativa, pues muchas proteínas poseen roles pleiotrópicos.

Esta situación lleva a que se busque no solo la existencia de genes comunes, sino que una interacción funcional conservada. Siguiendo el razonamiento de que a una mayor conservación de genes y sus respectivas interacciones, resulta menos probable estar frente a muchas funciones pleiotrópicas. Por esto la comparación que se llevará a cabo será a nivel de las redes de interacción génica.

Antes de comenzar la comparación es necesario referirse a las duplicaciones génicas y el efecto que las mismas tienen sobre las redes. A grandes rasgos se pueden describir dos mecanismos por el cual ocurren las duplicaciones. El primero ocurre a nivel de genes particulares. Esto puede ocurrir por errores en el entrecruzamiento (*crossing-over*) (revisado por Griffith y col., 2005). Mientras que el otro

mecanismo se asocia del proceso de especiación por poliploidía. Ello consiste en un fenómeno raro en los animales, pero muy frecuente en las plantas. En él ocurre un problema en la meiosis durante la disyunción de los cromosomas. Normalmente, si esto ocurre en un solo gameto surgirán complicaciones cuando el huevo fecundado efectúe las mitosis propias del clivaje. Sin embargo, hay otros casos en los que se genera un individuo viable el cual inmediatamente posee una dotación doble de cromosomas que sus padres. Esta condición produce un aislamiento reproductivo que imposibilita el cruzarse con los organismos de la misma especie que la de sus padres (Solomon y cols., 2001). A nivel de los genes probablemente las consecuencias sean similares a las duplicaciones de genes particulares.

La primera consecuencia de la duplicación génica corresponde a una redundancia funcional. De esta manera lo que antes hacía un solo gen ahora lo hacen dos. Esto en algunos casos podría tener consecuencias asociadas a efectos de dosis. No obstante, esto sería una situación más bien transitoria. Análisis efectuados sobre los genes duplicados en el genoma de levadura demuestran que solo en aquellos duplicados recientemente ($K_s^1 < 0,5$) la fracción de las interacciones compartidas (f) es moderadamente alta ($0,5 < f < 0,6$), mientras que entre los duplicados más distantes ($K < 0,15$) se comparte menos del 15% de las interacciones. La ventana temporal en la que ocurre esto es de aproximadamente 50 millones de años. En este estudio evidencian la aparición de 270 nuevas interacciones entre los $3,14 \times 10^5$ posibles pares de proteínas por millón de años. Lo interesante es que la estructura global de la red no se modifica de manera drástica, debido a que las distintas funciones divergen rápidamente. Dicho de otra manera, la divergencia funcional amortigua el efecto que la duplicación génica tendría sobre la distribución de grados en la red (Wagner, 2003).

Se han descrito dos condiciones que permiten a las redes que la distribución de sus grados mantenga una distribución de ley de potencia (*power-law distribution*). Ellas son: (1) añadir nuevos nodos a la red y (2) que la probabilidad de que estos nuevos nodos interactúen con los nodos altamente conectados sea mayor que la probabilidad de que lo hagan con los menormente conectados (“principio del enriquecimiento”). La primera condición se ha logrado probar y para la segunda pese a no tenerse

¹ K_s o dS : corresponde a una medida de las sustituciones en la secuencia nucleotídicas que no afectan la composición amino acídica de la proteína.

suficientes datos, con los que se poseen se observa una fuerte tendencia lineal (Wagner, 2003). Notar que todo esto se ha hecho en base a redes de interacción de doble híbrido en levadura.

De esta manera, los genes duplicados pueden tener diferentes destinos, tomando nuevas funciones (neofuncionalización), que las funciones originales del gen ancestral se particionen entre los nuevos duplicados (subfuncionalización) o que una de las copias degenera y se pierda (Cresko y col., 2003).

En vertebrados también se ha documentado el fenómeno de la duplicación génica. En particular, bien conocido es el caso de la duplicación a nivel de todo el genoma que sucede hacia la base de la radiación de los actinopterigios hace más de 300 millones de años (Taylor y col., 2003). Esto explica la presencia de varios parálogos para un mismo gen en los genomas de los peces. Un par de ejemplos son: *sox9a* y *sox9b* (Cresko y col., 2003) o *fgf8a* y *fgf8b* (Jovelín y col., 2007).

Pese a que parámetros globales de la red, como la distribución de grados, se mantienen incluso ante un evento de duplicación génica, a nivel de interacciones particulares se encontrarán diferencias. Ellas se evidencian en los casos en los que aún existe redundancia génica o ha sucedido un significativo cambio en la funcionalidad pese a variaciones menores en la secuencia. Dado que el número de proteínas que se estudiarán en las redes construidas es pequeño, casos como los mencionados son muy notorios.

La situación en la que esto se hace más evidente es al momento de tratar de asignar ortólogos únicos a genes presentes en *Drosophila*. Ello resulta impracticable dado que en varias ocasiones más de una secuencia presenta altos y similares porcentajes de identidad.

2.2.- Comparación cualitativa de las redes

La mayoría de las similitudes encontradas entre las dos redes de interacción génica se relacionan con vías de señalización comunes. La vía de Hh/Shh incluso presenta semejanza respecto a las orientaciones respectivas a los ejes de la extremidad. Presentando *hh/shh* una expresión en la zona posterior (Capdevila y Johnson, 2000). Sin embargo, una de las principales diferencias se relaciona con la forma en la que se activa la vía. En el pez cebra tiene una capital importancia el RA y *dHAND* (revisado por Mercader, 2007), pero estos elementos no se han encontrado descritos en el disco imaginal de pata. Otra diferencia se relaciona con los genes que son activados por la vía. En el pez cebra se ha descrito un

importante rol asociado a activaciones e inhibiciones de genes Hox. En *Drosophila*, no se ha encontrado alusión a algo similar. Una tercera diferencia, anticipada en la sección anterior, se relaciona con la existencia de varios parálogos en el pez cebra. Por ejemplo, dos *ptc* (*ptc1* y *ptc2*), tres *gli* (*gli1*, *gli2* y *gli3*) o tres *hh* (*shh*, *ihh* y *twhh*). No obstante, la forma general de acción de la vía de Hh/Shh es conservada.

Respecto a las vías de Dpp/Bmp y Wg/Wnt también se encuentran elementos de las mismas en ambas estructuras. Sin embargo, en el pez cebra no es común que se reporte alguna expresión génica en términos de dorsal o ventral, por lo tanto ello no pudo ser corroborado. No obstante, en tetrápodos esta información si es reportada efectivamente, en este grupo de animales se encuentra que las vías de señalización tienen una ubicación invertida respecto de los insectos.

Resulta muy difícil referirse a una comparación a nivel de todos los componentes particulares de las vías de señalización, debido a que no se encuentran equivalentemente descritos. Referente a la vía de Wg/Wnt, para la aleta pectoral del pez cebra solo se ha descrito la presencia de algunos genes de ligandos (*wnt2b* (Mercader y col., 2006), *wnt3a* (revisado por Ng y col., 2002) y *wnt7a* (revisado por Mercader, 2007)) y *tcf7*, el cual participa en el complejo que estimula la transcripción. Por su parte, en *Drosophila*, se ha descrito presencia del ligando (*wg*). Respecto a la vía Dpp/Bmp la situación es similar. Se ha descrito la presencia de los ligandos (*dpp* y *bmp2-4*), mas no el resto de la vía. Salvo por uno de los genes objetivos de *dpp* llamado *omb*, el cual al igual que su respectivo ortólogo, *tbx2-3*, en pez cebra se expresa en la extremidad (Ruvinsky y col., 2000; Robeiro y col., 2007). Es relevante mencionar que la proteína Dpp/Bmp2-4 pertenece a la familia TGF- β , la cual se encuentra presente en los animales radiados y bilaterales, involucrada en procesos claves en los metazoos (revisado por Herpin y col., 2005). En tanto, expresándose en el disco imaginal de pata y participación descrita en las tres vías de señalización se encuentra *engrailed* (revisado por Kyoda y col., 1999; revisado por Angelini y Kaufman, 2005), uno de cuyos parálogos (*eng1*) también están en la aleta del pez cebra (Hatta y col., 1991; Neumann y col., 1999).

En *Drosophila*, se ha descrito que los HSPG son necesarios para el funcionamiento de las vías de Dpp, Hh y Wg (Bornemann y col., 2004). Equivalentemente, en el pez cebra hay presencia de HSPG en la aleta pectoral (Norton y col., 2005). Muy posiblemente tenga un rol similar. De hecho, mutantes en las

enzimas implicadas en su síntesis (el mutante *dak* presenta un defecto en *ext2*; y el mutante *boxer*, posee un defecto en *extl3*) hay problemas en el desarrollo de la aleta pectoral.

En el desarrollo de ambas estructuras se encontraron receptores tirosina quinasa (RTK). En particular, en centro del disco imaginal de la pata de la mosca se encuentra *EGFR* además de una serie de proteínas asociados (Vn, Rho, Ru, Klu y Trh). En la aleta del pez cebra se ha encontrado *EGFR* al igual que otros receptores tirosina quinasa (RTK), *fgfr2* y *fgfr2c* (Harvey y col., 2004; Norton y col., 2005). Los ligandos de estos dos últimos corresponden a proteínas Fgf. Ellos son de una gran importancia en el desarrollo de la aleta. Mutaciones de las mismas llevan a alteraciones mayores en la estructura. Por ejemplo, en el mutantes *ika* (*fgf24*) falla la formación del AER, mientras que en el *dae* (*fgf10*) no se desarrolla la yema de la aleta. En *Drosophila*, no se encuentra una familia de genes con roles equivalentes. Pero, en ambas estructuras se han descrito antagonistas de la vía (*sty/spry2-4*) (Fürthauer y col., 2004).

Además, se ha descrito la existencia de dos circuitos de interacciones bien conservados. En el primero de ellos se encuentran implicados tres genes *hth/meis – exd/pbx – tsh/tsh1*. Según lo que se ha descrito en *Drosophila*, *hth* estimula la translocación al núcleo de *exd* y este último activa a *tsh*, la cual se une al DNA. Existe evidencia de que algo similar sucede en el pez cebra. El segundo circuito conservado, corresponde al establecido por *ss/ahr – tgo/arnt*. El primer componente (*ss/ahr*) se une al segundo (*tgo/arnt*) el cual entra al núcleo y activa la transcripción de genes. Un aspecto que resulta interesante, corresponde a la presencia de ortólogos de *hth* y *ss* en el pez cebra. Llama la atención el hecho de que estos genes sean descritos, en *Drosophila*, como selectores homeóticos que otorgan identidad a una estructura ancestral (*ground state appendage*). La presencia de ellos en la aleta del pez cebra se puede interpretar de dos formas: (1) la divergencia entre artrópodos y vertebrados fue posterior a que dichos genes tomaran un rol en la especificación de extremidades o (2) ambos genes fueron reclutados posterior a la divergencia en la evolución de los vertebrados. Notar que la primera opción, requiere que el modelo planteado para explicar la diferenciación de la pata de *Drosophila* sea cierto (Duncan y col., 1998).

Interesantemente, se ha descrito un caso de una proteína conservada, cuyos ortólogos en vertebrado parecieran haber sufrido un proceso de subfuncionalización. Esta proteína es *ap*, ella en el ala de *Drosophila* se asocia a crecimiento y diferenciación. Mientras que en la extremidad de vertebrados,

lmx1 tiene un rol asociado a la diferenciación dorsal y *lhx2* se relaciona con crecimiento (Milán y col., 2001). Notar que *lmx1* no corresponde a un ortólogo real de *ap*, pese a compartir un LIM homeodominio. De todos modos, *ap* se expresa en la pata de *Drosophila* (revisado por Kojima, 2004) y *lhx2* se ha descrito en la aleta pectoral de pez cebra (Seth y col., 2006).

Respecto a los factores de transcripción se encuentran varios ejemplos de conservación: *cll/hox11*, *msh/msx*, *dll/dlx*, *odd/osr2* y *D-sp1/sp8*. Notar que en el caso de *dll* y *msh* existe más de un parálogo en el pez cebra. Situación similar se encuentra con el co-represor transcripcional *dac* y el co-factor transcripcional *chip*. En ambos, casos existen más de un parálogo descrito en el pez cebra. No obstante, no están reportadas mayores diferencias funcionales.

En la literatura asociada a *Drosophila*, no se encontraron los patrones de expresión en disco imaginal de casi ninguno de los ortólogos de los genes *Hox* presentes en la aleta del pez cebra. Sin embargo, se ha comparado la presencia de los genes implicados en la polarización P/D (*dll*, *exd*, *dac*, *al*, *bab*) con el rol que cumplen los genes *Hox* en los distintos segmentos de la extremidad de vertebrado (Couso y Bishop, 1998).

Los grupos de genes que se encontraron conservados son muy similares a los descritos por Pueyo y Couso (2005) en un trabajo de revisión en el cual comparan la pata de *Drosophila* con la extremidad de un tetrápodo. Dado que el desarrollo temprano es similar en tetrápodos y actinopterigios, el trabajo de tesis aquí desarrollado tiene grandes similitudes con aquel recién citado. Las principales diferencias se refieren a los genes y procesos implicados en el desarrollo del autópodo. Sin embargo, este proceso es tan tardío que no se consideró la expresión de genes en un estadio equivalente en el pez cebra. Una segunda diferencia se relaciona con la consideración de algunos genes que no son mencionados en el trabajo de Pueyo y Couso (2005). Entre ellos están *EGFR/EGFR*, *chip/lbd*, *sty/spry*, *D-sp1/sp8*, *ss/ahr* y *tgo/arnt*. Sin embargo, al buscar la expresión de los mismos en tetrápodos se encuentra que *spry1-2-4* (Goldman y col., 2000) y *sp8* (Kawakami y col., 2004) se expresa en ratón. Situación diferente sucede con *EGFR/EGFR*, *ss/ahr* y *tgo/arnt*. Llama la atención la ausencia del circuito de interacción compuesto por *ahr* y *arnt*. Ello podría corresponder a una diferencia en la red de interacciones génicas entre peces y tetrápodos. No obstante, el conocimiento actual es muy preliminar para afirmarlo certeramente. De todos modos, resulta

interesante que dos proteínas involucradas en activar transcripción se encuentren expresadas en extremidades de peces e insectos y no en tetrápodos. Posiblemente, estos genes en pez cebra tengan implicancias a nivel muy particular, más que en el establecimiento de patrones en la aleta. De hecho, la mayoría de sus estudios los relacionan con respuesta a contaminantes (Andreasen y col., 2002).

2.3.- Comparación cuantitativa de las redes

Conectancia

La primera medida que se utilizó para comparar las redes génicas fue su conectancia. Ella en todos los casos analizados resultó ser menor a un 10%, lo cual se encuentra dentro de los rangos normales encontrados en diversas redes biológicas (comunicación personal Profesor Rodrigo Ramos). Al comparar las conectancias calculadas a partir de las matrices de Mosca y Mosca completa, se encuentra que en los tres casos calculados (Activaciones, Inhibiciones e Interacciones) ella es mayor en las matrices de Mosca. Recordar que en esta matriz se omitieron aquellos genes que sin ser explícitamente descrito su patrón de expresión en el disco imaginal de pata, se habían incluido por pertenecer a vías de señalización en las que varios de sus componentes estaban descritos. El aumento en la conectancia en las matrices de Mosca implica que los genes incluidos arbitrariamente se encontraban pobremente conectados (explicable por la falta de estudio de los mismos). Por lo tanto, su efecto en la conectancia se relacionaba con disminuir el número de interacciones porcentuales respecto al total posible. Recordar que el número de interacciones máximas posibles sigue una ley cuadrática cuya base es el número de nodos (n^2). Esta situación resulta esperable, pues los genes incluidos arbitrariamente solo poseían las interacciones descritas en sus respectivas vías de señalización.

Por otro lado, las conectancias reportadas en las tres matrices de Pez son menores que sus equivalentes tanto en Mosca como en Mosca completa. Ello se puede explicar por el hecho de que existen menos estudios en este modelo. Por ello gran cantidad de interacciones no se han reportado aún. Dado que en pez cebra se encuentran varios genes con más de un parálogo sería interesante evaluar cual es el efecto de las duplicaciones de genes en una red de interacción génica.

Un efecto similar podría justificar el hecho de que en las tres matrices principales estudiadas (Mosca, Mosca Completa y Pez), la matriz de inhibiciones siempre posee una conectancia menor que la de activaciones. Ello llega a ser de un orden de magnitud en el caso de Pez. Sin que pueda ser probado estadísticamente, pareciera ser que las inhibiciones resultan ser más difíciles de identificar que los efectos de activación. Por ejemplo, antes de 2008 se pensaba que *dac* activaba a *dll*. En tanto ambos genes eran activados por *dpp* y reprimidos por *brk* (Fig. 26a). Pero en 2008, Estella y col. describen una nueva organización para este circuito, *brk* seguiría actuando como represor de *dll* y *dac*. Sin embargo, *dpp* no tendría efecto directo en la activación de *dll*, sino que actuaría como represor de *brk*. Así la activación de *dpp* corresponde a la inhibición de un inhibidor (Fig. 26b). Por lo tanto, las activaciones podrían encontrarse sobre representadas, mientras que las inhibiciones sub representadas. Notar que el número de interacciones inhibitorias en la matriz de pez cebra representan solo el 12% de las interacciones totales. En las matrices de *Drosophila*, en cambio, bordean el 50%. De todos modos, no hay razones para suponer que una distribución equivalente entre inhibiciones y activaciones sea un resultado esperable.

Distribución de grados

Al hacer un histograma de frecuencias de los grados (número de interacciones) que tienen los nodos en una red, es posible visualizar que conectividad es la más frecuente. En la mayoría de las redes estudiadas se ha encontrado que al transformar dicho gráfico en una escala de doble logaritmo se obtiene una línea recta. A esto se le ha llamado distribución de ley de potencia (*power-law distribution*) (revisado por Junker, 2008). Este tipo de gráfico se hizo para las matrices construidas. Notar que por cada matriz se pueden obtener dos gráficos, uno correspondiente a todas las entradas (IN) y otro correspondiente a las salidas (OUT). Por lo tanto, se obtienen 18 gráficos. Con ellos se hacen 2 análisis.

El primero consiste en efectuar una regresión lineal y comparar los diferentes R^2 , los cuales representan la proporción de la variabilidad total que es explicada por la regresión. Pese a obtenerse en general valores altos ($R^2 > 0,80$), en varios casos (Mosca Completa Activación IN; Mosca Completa Inhibición IN; Pez Activación OUT; Mosca Completa Interacciones IN/OUT; Mosca Interacciones IN/OUT; Pez Activación OUT; Pez Interacciones OUT) pareciera ser que la regresión lineal no es la más adecuada. Sin embargo, no se efectuaron pruebas de bondad de ajuste para encontrar el mejor modelo.

Ello no fue considerado necesario, ya que se tienen muy pocos datos como para poder afirmar que ellos siguen una distribución de ley de potencia (se necesitarían puntos en tres órdenes de magnitud distintos). Por tanto, se consideró como suficiente el ver que hay una tendencia a la regresión lineal, por tanto a una distribución de ley de potencia.

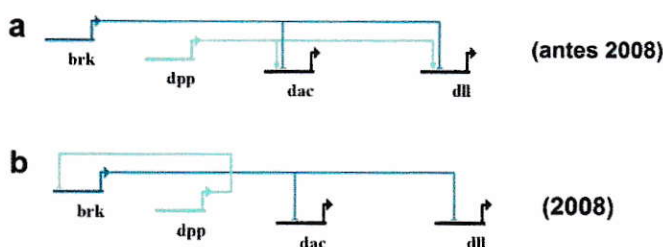


Figura 26: Modificación de una red en función de nuevo conocimiento. Se muestra el ejemplo de red en la que se encuentra que lo que una activación corresponde a una inhibición de una inhibición. (a) Supuesta estructura de la red hasta el año 2008. (b) Estructura de la red según conocimiento actual, publicado por Estella y col. (2008)

El segundo análisis consistió en comparar la homogeneidad de pendientes en los gráficos generados a partir de las matrices denominadas “Interacciones”. Se encontró que tanto en los gráficos de entradas (IN) como en los de salidas (OUT) respectivos a las matrices de Mosca y Mosca Completa no hay diferencias significativas (Tabla 9). Ello significa que la forma en la que cambian las frecuencias acumuladas respecto al grado es igual al considerar solo las activaciones o solo las inhibiciones, en ambas matrices. Por lo tanto, la inclusión arbitraria de 18 genes no tiene un efecto significativo en la forma que cambia la frecuencia de los grados.

El hecho de no encontrar diferencias significativas entre las pendientes del gráfico IN y OUT no es necesariamente esperable, pues se pueden dar casos de genes que reciban muchas interacciones (activaciones o inhibiciones), pero no ejerzan efectos sobre ningún otro; o viceversa. Sin que se haya hecho esta prueba en los gráficos de Pez se encontró que en la matriz de las activaciones existe un nodo muy conectado. Éste corresponde a *shh* y la mayoría de nodos con los que interactúa se tratan de genes Hox. En el gráfico correspondiente a las entradas (IN), no se observa ningún nodo tan conectado y se ve que hay una variación prácticamente lineal de la variación en la frecuencia acumulada de la conectividad.

La consecuencia de una distribución de ley de potencia consiste en que existen muchos nodos (genes) que interactúan con pocos nodos (genes); y pocos nodos (genes) que interactúan con muchos. Esto se asocia a la presencia de robustez en el sistema. La robustez se ha definido como la habilidad de sistema de seguir funcionando pese a cambios sustanciales en sus componentes (revisado por Bornholdt y Sneppen, 2000). En este tipo de redes la eliminación, por azar, de algún nodo muy conectado es poco probable. Por lo tanto, la misma puede resistir mejor a modificaciones. En consideración de una red implicada en el desarrollo podrían identificarse a los “genes maestros” como aquellos que se encuentran altamente conectados.

Sin embargo, es necesario indicar que este patrón encontrado podría ser la consecuencia de otro fenómeno no relacionado con el desarrollo, sino que con la forma en la que se realiza la investigación. Es probable que aquellos genes que son más estudiados, independiente su rol en el desarrollo, tengan descritas más interacciones por lo que esto sea lo que produce la distribución de potencias. De todos modos, es muy razonable pensar que el mayor estudio de un gen se justifica por la importancia que se ha encontrado que tiene el mismo en el desarrollo. Por lo tanto, incluso considerando el sesgo propio de la investigación, la distribución encontrada podría tener un sentido biológico efectivamente.

Promedio de interacciones por nodo

El promedio de interacciones por nodo fue calculado para las 9 matrices obtenidas (Tabla 10). En prácticamente todos los casos se obtuvieron desviaciones estándar iguales o mayores al promedio. Ello resulta esperable dada la tendencia a una distribución de ley de potencias.

3.- Trabajo bioinformático

Con la finalidad de asegurar que por errores de búsqueda no se hayan incluido genes conservados efectivamente descritos se hizo un BLAST bidireccional con los genes de *Drosophila* que no se encontraban conservados (Tabla 6). Utilizando como criterios de selección: % Identidad, % Cobertura, Valor E y BitScore se encontraron 10 genes conservados. En la mayoría de estos casos resultaba evidente la ortología, de hecho algunos tenían incluso el mismo nombre. Por lo tanto el método fue útil para cubrir

vacíos de la búsqueda en la bibliografía. Además, se obtuvo información de comparación de muchas de las secuencias correspondientes a los potenciales genes conservados.

4.- Trabajo experimental

4.1.- Patrones de expresión encontrados por hibridación *in situ*

Las redes construidas se utilizaron para tener un panorama general del desarrollo de ambas estructuras y de esta manera poder planificar experimentos. Para cada uno de los genes calificados como potencial candidato se determinó con que genes interactúa en la red de *Drosophila* y si estos tienen ortólogos descritos en la aleta de pez cebra. Además, se buscó información adicional (ubicación filogenética o fenotipos de mutantes) para evaluar la factibilidad de la conservación.

Se efectuaron hibridaciones *in situ* para *barhl1.1 (barh1)*, *barhl1.2 (barh3)*, *alk8*, *actr11a*, *actr11b*, *fz8a* y *bmpr1a*. También hay casos en los que se consiguió el clon, pero no logró/alcanzó a hacer la sonda: *arx*, *disp1*, *disp2* y *β -catenina-1*. En tanto, no se consiguió el clon de: *dvl2*, *sp3*, *gsk3 β* y *ffj*. Además, mediante comunicación personal (Rebecca Wingert, PhD) fue informado que *gata3* no se expresa en las aletas en la ventana temporal esperada.

En las hibridaciones *in situ* efectuadas se encontró gran diversidad de resultados. Ellos pasarán a ser discutidos a continuación. El primer par de genes probados fueron los parálogos de *bar* en pez cebra, *barhl1.1 (barh1)* y *barhl1.2 (barh3)*. Por la gran cantidad de interacciones con genes cuyos ortólogos se encuentran expresados en la aleta de pez cebra resultaba muy esperable encontrarlos. Sin embargo, no se detectó la presencia de ninguno de los dos en las aletas. En su lugar se evidenció expresión en la zona ubicada posterior al ojo. Esto con pequeñas diferencias en la forma de la marca según el gen (Fig. 16a, b). En estadios previos a las 72 hpf se ha descrito un patrón asociado a distintas regiones del sistema nervioso central (Colombo y col., 2006). Por ello lo encontrado corresponde probablemente a remanentes de esos sitios de expresión. En la literatura se señala que los genes *bar* se encuentran relacionados esencialmente a procesos neurales en vertebrados (Colombo y col., 2006).

Un segundo gen buscado por hibridación *in situ* correspondió a *fz8a*. La principal razón para esperar encontrar este gen se relacionaba con el hecho que el mismo es de la familia de receptores de *wg*,

gen con importante rol en la diferenciación ventral del disco imaginal de pata y cuyo ortólogo (*wnt3a*) se expresa en la aleta pectoral. El objetivo de esta hibridación *in situ* fue corroborar lo descrito por Thisse y Thisse (2004). Ellos muestran patrones de expresión desde las 19 hpf hasta las 72 hpf. En estos no se encuentra reportada expresión en la aleta pectoral, no obstante está la posibilidad de que no se muy intensa la marca y por ello no se reporte. Al efectuar los experimentos en los embriones de 24 hpf y 48 hpf no se identifica un patrón claro de marca, mientras que en los de 72 hpf se ve una leve tinción en la notocorda y la zona posterior al ojo (Fig. 22). El hecho de que en los dos primeros estadios no se identifique un patrón claro hace dudar de la calidad de la sonda. En los reportes previos se encuentran marcas muy conspicuas, pero no son reproducidas. Así la señal encontrada a las 72 hpf podría ser un artificio o señal inespecífica. Por lo tanto, no se considerará como un patrón de expresión efectivo lo encontrado para este gen.

También se estudió el patrón de expresión mostrado por *bmpr1a*. Este gen corresponde al ortólogo de *tkv. thick veins* es el receptor tipo I de *dpp* cuya expresión se ha descrito en todo el disco imaginal de pata en larva 3 (Azpiazú y col., 2002). Por otro lado, se ha descrito la existencia de ratones mutantes condicionales de *bmpr1a* los cuales tienen problemas en la formación del AER y alteraciones en el patrón D/V (Guha y col., 2002). Todo lo anterior junto con el hecho de que los ortólogos de su ligando, *bmp2b-4* se encuentran en la aleta (Norton y col., 2005; Rothschild y col., 2009), hacen pensar que este gen corresponde a un buen candidato. Finalmente, se encontró expresión a las 48 hpf y a las 72 hpf. En el primer estadio indicado se encuentra una marca en el oído y muy levemente en la notocorda (Fig. 23a, b). Resulta esperable la expresión de un receptor de Bmp en el oído, pues se ha descrito un patrón de expresión conservado de *bmp2b* y *bmp4* en el oído interno de vertebrados. En particular, para el pez cebra se ha descrito un rol tardío de *bmp2b* en el desarrollo de los canales semicirculares (Hammond y col., 2009). La ausencia de *bmpr1a* en la aleta puede explicarse por el hecho de que otros parálogos los que se están expresando. Por otro lado, a las 72 hpf se observa marca muy tenue en la notocorda y en la zona posterior/ventral al ojo (Fig. 1c). Por lo débil de la marca resulta difícil evaluarla.

Otro gen analizado por hibridación *in situ* fue *alk8*, ortólogo de *sax* en *Drosophila*. *sax* corresponde a un receptor tipo I de *dpp*. Como se indicó anteriormente, los ortólogos de *dpp* se expresan en la aleta. Además, el mutante de *alk8*, *lost-a-fin (laf)*, presenta embriones dorsalizados y pérdida aleta

caudal ventral. No se ha observado la aleta pectoral larval (van Eeden, 1996). Por otro lado, en la base de datos ZFIN se encontró una sugerente fotografía de las hibridaciones *in situ* masivas desarrolladas por Thisse y Thisse (2004), en la que se observa marca en las aletas pectorales de algunos embriones (Fig. 19).

La principal complicación de este experimento radica en la presencia de diferencias en los patrones en las distintas técnicas. El método desarrollado por Fuentes y Fernández (2009) ha permitido encontrar nuevos patrones de expresión utilizando otras sondas, sin embargo estos nuevos patrones incluyen los ya descritos (comunicación personal). Al momento de comparar los tres experimentos solo se considerarán aquellos en los que se utilizó la sonda 4x. Esto debido a que la falta de marca en el otro experimento se puede justificar por la utilización de una sonda demasiado diluida (2x). La diferencia entre los dos experimentos desarrollados con la sonda 4x radica en el método. El embrión tratado con el método de Fuentes y Fernández (2009) repite la marca en la notocorda y además muestra señal en la región cefálica (pareciera incluir a los ojos y es posible que la marca del oído quede oculta) y las aletas pectorales. Esto implicaría que la cantidad de RNA presente en estas últimas dos estructuras es muy baja y requiere de técnicas más sensibles que las tradicionales para detectarla.

Al comparar este resultado con lo encontrado en la literatura se ven congruencias. Por ejemplo, Yelick y col. (1998) reportan expresión en ojo y tubo neural a las 48 hpf. Sin embargo, la marca en la aleta no es reportada. Ello podría deberse a que hay una cantidad muy baja del RNA de *alk8*. De todos, modos la marca en la aleta pectoral es congruente con lo mostrado por Thisse y Thisse. (2004).

Finalmente, se estudió la expresión de dos ortólogos de *punt* ellos fueron *actrIIa* y *actrIIb*. Inicialmente, solo se pensaba buscar este último, sin embargo la posibilidad de contrastar su patrón de expresión con el de un parálogo fue una buena oportunidad para evidenciar la posible divergencia funcional de estos genes. Las razones principales para querer buscarlos se relacionan con el hecho de que son los ortólogos de *punt*, el cual es el receptor de tipo II de *dpp*. Si bien el patrón de expresión del mismo no ha sido reportado en el disco imaginal de la pata existe evidencia que sugiere su posible rol en el desarrollo de esta estructura. La presencia de líneas clonales carentes de función en la zona ventral o lateral no tienen efectos en la pata adulta, en tanto en la región dorsal, genera bifurcaciones en la pata

adulta y duplicaciones de los peines sexuales en los machos (Penton y Hoffmann, 1996). Por otro lado, *actr11b* tendría un rol de receptor tipo II para *bmp2/4* en vertebrados (Nagaso y col., 1999).

La hibridación *in situ* de *actr11b* fue hecha a las 24 hpf y 48 hpf, sin embargo solo en este último tiempo se encontró expresión. El patrón encontrado es muy conspicuo, corresponde a una marca en el borde superior e inferior de la cola, además de una intensa marca en la aleta pectoral (Fig. 20a, c, d). Una vista dorsal (Fig. 20b) de esta última muestra que la marca pareciera concentrarse en el borde de la aleta, lo que correspondería al AER. Este patrón corresponde un dato preliminar para confirmación de la predicción realizada (*actr11b* tendría un rol de receptor de *bmp2b*). Una vez que se ha reportado la expresión, el siguiente paso correspondería a encontrar evidencia funcional de la interacción entre *actr11b* y *bmp2b* o *bmp4*. Al comparar con patrones reportados en la literatura (Albertson y col., 2005) se evidencia la falta de marca en la región cefálica. Además, en el trabajo encontrado no se refieren a la expresión en las aletas, sin embargo es posible reconocer en la hibridación *in situ* una tenue marca en lo que podría ser la aleta pectoral (Albertson y col., 2005).

Por otro lado, la hibridación *in situ* de *actr11a* fue efectuada a las 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. En cada estadio se encontraron diferencias en sus patrones de expresión encontrados. A las 24 hpf se observa una marca que se extiende en todo el sistema nervioso central, pudiéndose identificar incluso la zona en la que comienzan los rombómeros (Fig. 21a). En tanto, en los embriones de 48 hpf hay marca en la notocorda y en la zona posterior al ojo (Fig. 21b). Un patrón similar se observa en el embrión de 72 hpf (Fig. 21c). La diferencia radica en que la marca en la zona posterior es más prolongada y se extiende tangencialmente hasta la zona dorsal del ojo. Además, en este estadio se ve una mayor cantidad de marca de fondo. Sin embargo, no se encuentra marca en la aleta pectoral. El patrón encontrado asocia a *actr11a* directamente con el sistema nervioso. Ello es congruente con lo reportado en la literatura. De hecho el patrón encontrado a las 24 hpf es prácticamente igual al descrito por Albertson y col. (2005) no así el patrón de las 48 hpf. En el trabajo citado, muestran una intensa marca en la región craneal, ella no es tan clara en la hibridación *in situ* realizada, sin embargo, se observa un pequeño ensombrecimiento, lo cual podría corresponder a una tenue marca.

En resumen, a partir de las 7 hibridaciones *in situ* realizadas se encontró expresión de dos genes en la aleta pectoral: *alk8* y *actr11b*. Ambos corresponden a receptores de activina, la cual junto con los ligandos de Bmp conforman la super familia de ligandos TGF- β (Gilbert, 2003). Notar que se ha descrito que Actr11b tendría un rol como receptor de Bmp2/4 en vertebrados (Nagaso *y col.*, 1999). Además, el ortólogo en mosca de *alk8* (*sax*) intensificaría la señal intracelular transmitida por el receptor de *dpp* llamado *tkv* (revisado por Raftery y Sutherland, 1999). Por lo tanto, existe la posibilidad que tenga un rol similar en vertebrado.

4.2.- Evidencia de la actividad de una vía de señalización: Presencia de pSmad

La presencia de *bmp2b* y *bmp4* en la aleta pectoral ha sido reportada previamente (Norton *y col.*, 2005; Rothschild *y col.*, 2009). Además, se encontró la expresión del RNA de dos genes (*alk8* y *actr11b*) pertenecientes a la familia de receptores de activina, los cuales también se han asociado con la transducción de señales de Bmp. Por otro lado, se ha descrito que esta vía actúa en la región dorsal de la extremidad de tetrápodos (revisado por Niswander, 2003). Toda esta evidencia sugiere que la vía de Bmp podría estar actuando en el desarrollo de la aleta pectoral.

La forma en la que se evidenció la actividad de la vía sería mediante la búsqueda de la presencia de la forma fosforilada de Smad. Esto se refuerza por el hecho de que se ha descrito la presencia del RNA de *smad1*, *smad2*, *smad5*, *smad6b* y *smad9* (Thisse *y Thisse*, 2004; Thisse *y Thisse*, 2005) en la aleta pectoral del pez cebra. Para encontrar la presencia de la forma fosforilada de Smad se efectuó una inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo primario que reconoce la forma fosforilada de Smad1/5.

Se reveló la inmunohistoquímica utilizando el VECTASTAIN® UNIVERSAL Elite ABC KIT. Se encontró marca en la región inter hemisférica del cerebro medio y en el cerebro posterior, siendo muy intensa en su borde (Fig. 24b, e). Además, se encontró marca en la aleta pectoral. Al observar desde dorsal pareciera que ella es más intensa en el borde de la aleta, lo que corresponde al AER (Fig. 24c). Sin embargo, no es tan claro como la marca vista en *actr11b*. También se reveló la inmunohistoquímica con un anticuerpo secundario fluorescente. En este caso solo se observó la aleta. Aquí la marca encontrada fue muy débil y se ubica en la zona más distal de la aleta (Fig. 25 y Animación3D.lms). Probablemente, la

cantidad de proteína fosforilada es tan baja que con los métodos sin amplificación de señal ella no es fácilmente detectada.

Equivalentemente, en *Xenopus*, utilizando un anticuerpo primario contra Smad1/5/8 se ha encontrado la presencia de la proteína en la región ventral de la futura cola. Además, hay evidencia que la fosforilación de Smad sucede en la cola y que las proteínas Bmp cumplen un rol en el crecimiento de la misma (Beck y col., 2001). Esto resulta interesante en consideración de las similitudes que se han descrito entre la cola y la extremidad de un vertebrado (Mineli, 2000; 2003). Por otro lado, en congruencia con la hipótesis de la tesis, la presencia de *mad* ha sido reportada en la zona dorsal del disco imaginal de pata de *Drosophila* (Estella y Mann, 2008).

En síntesis, se encuentra la presencia de pSmad en las aletas, lo que evidenciaría que la vía de Bmp se encuentra activada en la misma. Sin embargo, de manera indirecta se evidencia que la cantidad de proteína es muy baja.

5.- Panorama general de los resultados experimentales

Los resultados de los experimentos realizados pueden interpretarse en el contexto del desarrollo de las aletas pectorales, en particular, el rol de la vía de Bmp. Al construir la red de interacciones en la literatura sólo se encuentra que se han descrito los ligandos *bmp2b* (Norton y col., 2005) y *bmp4* (Rothschild y col., 2009). Al efectuar los experimentos se encontró la expresión del RNA de dos genes (*alk8* y *actrIIb*) pertenecientes a la familia de receptores de activina. Para uno, *actrIIb*, de los que se ha descrito tendría un rol como receptor de *bmp2/4* en vertebrados (Nagaso y col., 1999). Además, existe evidencia indirecta de que su ortólogo en *Drosophila* podría participar en el desarrollo de la pata. Por su parte el ortólogo de *alk8*, *sax*, si bien no se ha descrito en la pata, es probable que se encuentre por estar asociado a la vía de Dpp. Además, se encuentra la forma fosforilada de la proteína Smad, la cual corresponde a un mensajero citosólico de la vía, que solo se encuentra cuando la misma se encuentra activa. pSmad tiene efectos sobre la transcripción (represión o activación). Congruentemente, en *Drosophila*, el RNA de *mad* es expresado en la región dorsal del disco imaginal. En conclusión, existe

evidencia para afirmar que la vía de Bmp, presente en la pata de *Drosophila*, se encontraría activa en el desarrollo de las aletas pectorales de pez cebra.

6.- Comparación con lo descrito en la literatura

En base a todas las conservaciones descritas, se pueden sacar algunas conclusiones generales y contrastarlas con lo que se ha descrito en la literatura. La primera de ellas consiste en que pese a la duplicación de varios genes en pez cebra, la forma en la que operan las distintas vías de señalización pareciera ser muy similar a como lo hacen en *Drosophila*. Ello se basa en la presencia de vías de señalización (vía de Hhh/Shh, vía de Dpp/Bmp, vía Wg/Wnt), pequeñas redes (*hth/meis – exd/pbx – tsh/tsh1* y *ss/ahr – tgo/arnt*) y factores de transcripción (*cll/hox11*, *msh/msx*, *dll/dlx*, *odd/osr2* y *D-spl/sp8*). Los primero dos elementos descritos podrían corresponder a módulos. Se define como un módulo a una sub-red de elementos interactuantes como unidades relativamente independientes del resto de la red (Schlosser y Thieffry, 2000). Como acepción particular, se pueden mencionar los módulos de desarrollo, los cuales corresponden a una parte del embrión que es cuasi-autónoma respecto a la formación de patrones o diferenciación, o también el concepto se ocupa para referirse a vías de señalización (Wagner y col., 2007). Es importante tener en cuenta, que la primera acepción de módulo de desarrollo es equivalente a la definición clásica de campo embrionario. Así la noción de módulo del desarrollo puede ser utilizada a nivel de fenotipo y genotipo (discutido en Gilbert y col., 1996). A nivel de red, un módulo corresponde a una vecindad de nodos con una densidad de interacciones entre ellos mayor que con el resto de la red (revisado por Guimerà y Nunes Amaral, 2005). Un factor que puede justificar la presencia de estos subcircuitos (módulos) conservados es su pleiotropía. El hecho de que la mayoría de ellos participe en otros procesos produce que existan más “compromisos” que aseguren la integridad del módulo. Así, especulativamente, se podría plantear una situación en la que un subcircuito, que no es muy importante en el desarrollo de la pata, podría conservarse debido a que tiene un rol relevante en otra estructura (para profundizar sobre la relación entre la función de un gen y su tasa evolutiva ver Apéndice IV: Factores que influyen la tasa evolutiva).

El encontrar modularidad asociada a las vías de señalización resulta congruente con las categorías en las que Davidson y Erwin (2006) han clasificado los elementos presentes en las redes génicas. Ellos han establecido cuatro categorías: “Kernels”, circuitos altamente conservados que presentan baja variabilidad, se asocian a la formación de planes corporales; “Plug-ins”, pequeños subcircuitos génicos cooptados en diferentes procesos del desarrollo, por ejemplo: las vías en las que participan los receptores tirosina quinansas (Fgfr, EGFR o Igfr) o los receptores serina/treonina quinasa (receptores de TGF- β , Activina, Nodal o Bmp), la vía Wnt, la vía Hedgehog y la vía Notch entre otras; “Switches I/O”, se refiere a aquellos grupos de genes, cuya activación desencadena una serie de interacciones, que finalizan en la diferenciación de segmentos corporales, también se les ha llamado “genes maestros” (Hox, por ejemplo); “Baterías génicas”, grupo de genes bajo un control regulatorio común, los cuales están implicados en procesos celulares específicos.

Notar que por la definición hecha por Davidson y Erwin (2006), los genes clasificados como “Plug-ins” participarían en diversos procesos del desarrollo. De hecho, gran cantidad de los genes descritos en el desarrollo de la aleta pectoral del pez cebra, también tienen un rol asociado a la regeneración de los radios de la aleta caudal (revisado por Iovine, 2007). Por lo tanto, su sola presencia, pareciera no poder ser usada como un buen argumento de ancestría común. De hecho, al hacer el seguimiento de un carácter macroscópico (tejido, órgano, etc.) debe considerarse que los procesos del desarrollo que lo forman actúan a nivel celular. A esta escala, muchos procesos, proliferación, apoptosis, diferenciación, etc. tienden a utilizar las mismas vías de señalización.

Por lo tanto, al extrapolar los mecanismos implicados en una dinámica celular a un nivel de órgano o sistema, inevitablemente se encontrará ubicuidad en algunos genes. Esta situación no los desaprueba como herramientas para probar ancestría común, sin embargo hace que sea necesario contrastar su existencia con la distribución del carácter estudiado en la filogenia. Pudiendo así dar soporte a la presencia de dichos genes gracias a una continuidad histórica de dicha estructura, en otras palabras, dado que se ha encontrado la estructura en el ancestro, es posible que también lo esté el gen. Además, el utilizar redes génicas lo más documentadas posibles, al momento de buscar relaciones de ancestría, reduce el problema de que sólo una vía de señalización particular sea la que está compartida. Recordar que sólo

observar una vía puede resultar engañoso, dado que la misma podría participar en la constitución de muchas estructuras diferentes. Por otro lado, el considerar el contexto morfológico en el que se desarrolla dicha red génica, puede ayudar a clarificar la evidencia a favor o en contra de la homología. En el caso aquí estudiado, la base morfológica que es equivalente es muy escasa. En cambio, a nivel de la red génica existen más elementos para efectuar la comparación. Se profundizará en esto posteriormente. Un segundo grupo de genes que podría ser clasificado, utilizando los criterios de Davidson y Erwin (2006), corresponden a aquellos implicados en la diferenciación de segmentos. En *Drosophila*, los genes, *dll*, *exd*, *dac*, *al*, *bab*, entre otros; y en el pez cebra los genes Hox. Ellos podrían incluirse en la categoría de “Switches I/O”.

Una segunda observación general, se relaciona con las implicancias biológicas de que se encuentre una tendencia a una distribución de ley de potencias. Ella se asocia con la existencia de pocos genes muy conectados y muchos genes poco conectados. Esta estructuración otorga robustez a un sistema, ello significa que es capaz de mantener su dinámica pese a que se retiren algunos de sus componentes. En consideración a la duplicación de genes presentes en el pez cebra y la reportada redundancia funcional de algunos de ellos, *ptc1* y *ptc2* (Koudij y col., 2005), por ejemplo, sería esperable que la red asociada a la aleta del pez cebra fuese más robusta. Resulta sugerente el hecho de que en pez cebra es posible bloquear la expresión o mutar un gen cuyo efecto es solamente tardío y restringido a una estructura particular. Por ejemplo, en los morfantes de *sall1* y *sall4*, se observa una aleta pectoral truncada, mas no se han determinado otros efectos fenotípicos (Harvey y col., 2006). En *Drosophila* también esto es posible, sin embargo pareciera ser menos común. Por procesos de subfuncionalización es posible que las diversas funciones de un gen ancestral se repartan en los nuevos parálogos (Force y col., 1999). Esto reduce el grado de pleiotropía de dicho gen, por lo tanto, resulta ser más “dispensable”. Posibles ejemplos de subfuncionalización (ellos pueden o no incluir efectos de neofuncionalización) evidenciados a cambios el patrón de expresión se han descrito para genes en los que uno de los parálogos se expresa en la aleta y el otro no. Un caso es *fgf8a* y *fgf8b*, aquí solo el primero se expresa en la aleta pectoral. Esto ha sido probado en *D. rerio* y *G. aculeatus* (Jovelín y col., 2008).

El hecho de que una red génica presente robustez podría ser importante para comprender la forma en la que evoluciona. Estudios teóricos sobre la evolución de redes génicas utilizan esta propiedad como el principio que regiría la evolución de las mismas (Bornholdt y Sneppen, 2000). En una revisión escrita por Bornholdt (2001) describe simulaciones en las que mediante sucesivas alteraciones de las interacciones entre los elementos de una red booleana recrean un posible proceso evolutivo. Como resultado de la dinámica de la red se puede obtener que ciertos nodos (genes) se encuentren activos y otros no. A esto se le ha llamado el “patrón de expresión”. Luego de cada alteración se compara el solapamiento del patrón resultante con el original. Para repetir el proceso solo se seleccionan aquellas redes en las que se mantiene el patrón. Por tanto, el principio que rige este “proceso evolutivo” es la mantención de un patrón generado por una red que es sucesivamente alterada.

La utilización de la robustez como un principio evolutivo marca una diferencia con lo que usualmente se considera como tal, la adecuación biológica o *fitness* (Bornholdt, 2001). Ésta consiste en una medida del éxito reproductivo de un individuo a lo largo de su vida, es decir incluye supervivencia y reproducción (Endler, 1986). Se considera que a través de sucesivas generaciones ocurre un proceso de optimización de los rasgos que lleva a un aumento en la adecuación biológica. Esto se representa mediante paisajes adaptativos o *fitness landscape* (Wright, 1932). Aquí se supone que los rasgos en optimización (altura, color, velocidad, etc.) presentan una variación dentro de una métrica definida (gradual). Sin embargo, si se consideran variaciones genómicas, ellas difícilmente pueden interpretarse de esta manera. Esto debido a que pueden ocurrir fenómenos como deleciones, duplicaciones, inserciones, etc. Inclusive la probabilidad de revertir una deleción en muchos casos es diferente a la probabilidad que la misma suceda. Estos rearrreglos genómicos no son acordes a los cambios graduales concebidos al pensar sólo en mutaciones puntuales. Por lo mismo, resulta difícil incluirlos al considerar un paisaje adaptativo. Las consecuencias fenotípicas de estos cambios pueden ser tan profundas y drásticas como la desaparición de apéndices en las regiones abdominales de los insectos (para más detalles sobre la relación entre *ubx* y la ausencia de apéndices en el abdomen de los insectos ver Galant y Carroll, 2002).

Un segundo aspecto que hace sentido al suponer que la robustez correspondería al principio para regir la evolución de las redes genéticas radica en el hecho que es compatible el fenómeno descrito como

“deriva de los sistemas de desarrollo” (abreviatura en inglés, SDD) (True y Haag, 2002). Éste consiste en que un mismo rasgo fenotípico es constituido por un proceso de desarrollo diferente en dos especies. Varias décadas antes De Beer haría alusión a este fenómeno mediante el siguiente aforismo; “homología en los fenotipos no implica similaridad en los genotipos” (1971). Un claro ejemplo de que un mismo rasgo no requiere necesariamente estar constituido por un mismo programa genético del desarrollo corresponde a los patrones de expresión involucrados en el desarrollo de la pata de *Oncopeltus fasciatus* en comparación con la de *Drosophila* (Fig. 27). Se puede observar como los territorios de expresión de genes, que usualmente tienen efectos fenotípicos profundos, se encuentran cambiados pese a que, a grandes rasgos, ambas patas poseen los mismos segmentos. Notar que casos como este pueden implicar modificaciones de la red de interacciones, en la que se encuentran implicados estos genes (sin que ellos necesariamente se modifiquen) y/o modificaciones regulatorias en *cis* de los mismos.

No es claro que tan difundido son los SDD en la constitución de diferentes estructuras. Sin embargo, dado que muchas estructuras homólogas están constituidas efectivamente por procesos de desarrollo similares (extremidades en vertebrados, por ejemplo) es probable que los SDD correspondan a situaciones particulares. Notar que la existencia de este fenómeno en cierta medida se contrapone con ideas expresadas por Davidson y Erwin (2006). Ellos plantean que los “Kernel” regulatorios, asociados a la constitución de los planes corporales, se habrían fijado tan temprano en la evolución de los animales, que cualquier cambio en el mismo haría inviable al embrión. Por esta razón, justifican la ausencia de nuevos planes corporales desde la Explosión Cámbrica. No obstante, esta noción no se encuentra exenta de debate (Coyne y col., 2006). Notar que en una situación extrema en la cual la posibilidad de construir rasgos con distintos procesos de desarrollo fuese muy alta; no tendría sentido la aproximación que aquí se ha tomado para inferir una posible red ancestral asociada al desarrollo de apéndices.

Independientemente a lo frecuente que sean los SDD o si la evolución de las redes génicas ocurre o no en base al principio de robustez, las redes construidas presentan varios elementos que han sido discutidos previamente en la literatura. Entre ellos se encuentra la posibilidad identificar cualitativamente módulos, el hecho de que la distribución de grados muestra una tendencia a ley de potencia y en el caso de la red del pez cebra se puede ver el efecto de eventos de duplicación génica. Esto, en cierta medida, valida

el procedimiento realizado para su construcción y abre paso a efectuar análisis posteriores junto con la mejora de la misma.

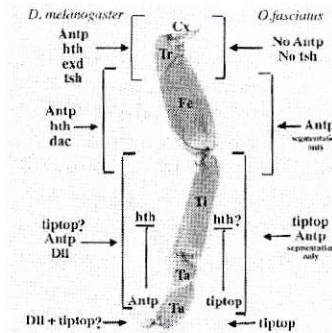


Figura 27: Ejemplo de deriva de los sistemas de desarrollo. Diferencias en los patrones de expresión de la pata de *Drosophila* y *Oncopeltus fasciatus*. La pata mostrada es de *O. fasciatus* (Herke y col., 2005).

7.- Las patas de la mosca y las aletas del pez: ¿Homología o analogía?

La hipótesis planteada inicialmente pudo comprobarse en términos generales. A través de la investigación teórica se encontraron varias redes de interacción génica conservadas. Por otro lado, experimentalmente se aportó evidencia a la presencia de la vía de Bmp en la aleta pectoral, esta vía previamente ha sido descrita en el disco imaginal de pata. ¿Es suficiente esto para probar una homología entre las dos estructuras?

Bajo los conceptos clásicos de biología evolutiva, los apéndices en vertebrados y artrópodos no son estructuras homólogas. Tampoco es posible darles ese estatus en consideración de evidencia histórica, debido a que no se conoce un fósil que pueda asignarse como el último ancestro común de los organismos bilaterales. No obstante, la gran cantidad de similitudes relacionadas con el desarrollo de las mismas han llamado la atención desde hace más de tres décadas. Actualmente, muchos investigadores (Géraudie, 1995; Shubin y col., 1997; Tabin y col., 1999; Capdevilla y col., 2000; Minelli, 2003; Pueyo y Couso, 2005; Iovine, 2007) se han referido a esta comparación y en mayor o menor medida indicado la existencia de un posible ancestro común poseedor del rasgo.

Previamente fue discutido el fenómeno de la deriva en los sistemas de desarrollo, presentándose el hecho de que estructuras homólogas no necesariamente en su desarrollo han de formarse con la

participación de genes homólogos. Por otro lado, dada la ubicuidad de las mismas vías del desarrollo en distintas estructuras, no resulta suficiente la simple presencia de genes ortólogos para justificar la homología. Entonces resulta necesario analizar un nivel superior de organización (referido de esta manera en Sanetra y col., 2005): las redes génicas. Si bien sería posible establecer homología entre ellas sigue siendo un problema abierto si ésta se corresponde con la homología de las estructuras en las que se encuentran implicadas (Laubichler, 2000).

En el contexto de las nuevas conceptualizaciones y siendo laxo en la utilización de las definiciones, mientras no se encuentre evidencia independiente que demuestre la existencia de un ancestro común con apéndices, se puede decir que los apéndices presentes en ambos organismos corresponden a homologías generativas. En cambio, si se considera la red, se estará en presencia de una homología parcial. Por otro lado, independiente sean o no homólogas históricas, los apéndices de vertebrados y artrópodos corresponden a estructuras homocráticas.

8.- Proyecciones y líneas futuras

El trabajo aquí realizado se constituye en una base para una gran cantidad de nuevas preguntas tanto teóricas como experimentales. En el aspecto teórico, las redes pueden constantemente ser actualizadas tanto incluyendo nuevos genes como modificando las interacciones. Además, una mejora en los datos asociados a la temporalidad en la que se expresan los genes podría ser de gran utilidad para comparar la dinámica de ambas redes en el desarrollo. Este podría ser una forma de comparar los procesos en organismos morfológicamente tan diferentes. En organismos morfológicamente similares se puede comparar la temporalidad con la que suceden ciertos hitos en el desarrollo (somitogénesis, gastrulación, formación de las extremidades, etc.). Sin embargo, cuando se presentan planes corporales diferentes ello es imposible. Por lo tanto el tratar de hacer una equivalencia entre ambos desarrollos resulta muy difícil. Por lo mostrado en este trabajo, pese a la divergencia morfológica existe cierta conservación en la red de interacciones. Así podría hacerse una comparación de ambos desarrollos siguiendo la evolución temporal de la red de interacciones. Para seguirla, una posibilidad sería ver como varían en el tiempo algunos parámetros globales como la conectividad. En el caso de tener datos de expresión génica con una

resolución temporal mayor podría probarse esta metodología. Otra posibilidad sería comparar el orden relativo con el que se van activando los distintos genes. Complementariamente, se puede tratar de analizar la red con métodos más sofisticados para evaluar la presencia de algún tipo de estructura /modularidad, por ejemplo.

En el aspecto experimental, hay tres vertientes de trabajo. La primera se relaciona con profundizar más el conocimiento de la vía Bmp en el desarrollo de la aleta. Esto se puede lograr buscando mediante hibridación *in situ* la presencia de otros componentes de la vía, o bien, evaluar el efecto de sobre expresar o bloquear la expresión de genes implicados en la misma. La segunda vertiente experimental se relaciona con evaluar el patrón de expresión de otros genes posiblemente conservados. Finalmente, se podría evidenciar la presencia de los genes, aquí reportados como conservados, en organismos ubicados en distintos puntos de la filogenia. Esto con el fin de encontrar lo generalizado o particular de su presencia.

CONCLUSIONES

- 1.- La conservación encontrada entre la red génica asociada al desarrollo de las extremidades en *D. melanogaster* y *D. rerio* se relaciona a vías de señalización, pequeños circuitos de 2 o 3 proteínas interactuantes y factores de transcripción.
- 2.- Las redes construidas presentan características descritas en otras redes: modularidad y tendencia a una ley de potencias en distribución de grados. Sin embargo, ambas características han sido descritas solo cualitativamente.
- 3.- La presencia de los transcritos de *actr11b* y *alk8*, junto con la forma fosforilada de Smad, sugieren que la vía de Bmp se encuentra activa en la aleta del pez cebra. Del mismo modo, se han descrito varios elementos de la misma en el disco imagina de pata de *Drosophila*.
- 4.- La generación de una red de interacciones es una herramienta útil para la planificación de experimentos, debido a que es posible resumir gran cantidad de información. No obstante, la pura consideración de posibles interacciones conservadas no es un criterio totalmente efectivo para predecir la presencia de un gen.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe G., Ide H. y Tamura K. 2007. Function of FGF signaling in the developmental process of the median fin fold in zebrafish. *Developmental Biology* 304: 355-366.
- Acampora D., Boyl P.P., Signore M., Martinez-Barbera J.P., Ilengo C., Puelles E., Annino A., Reichert H., Corte G. y Simeone A. 2001. OTD/OTX2 functional equivalence depends on 5' and 3' UTR-mediated control of *Otx2* mRNA for nucleo-cytoplasmic export and epiblast-restricted translation. *Development* 128:4801-4813.
- Akimenko M., Johnson S.L., Westerfield M. y Ekker M. 1995a. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development* 121: 347-357.
- Akimenko M.A., Ekker M. 1995b. Anterior duplication of the *Sonic hedgehog* expression pattern in the pectoral fin buds of zebrafish treated with retinoic acid. *Dev Biol.* 170:243-247.
- Albertson R.C., Payne-Ferreira T.L., Postlethwait J. y Yelick P.C. 2005. Zebrafish *acvr2a* and *acvr2b* Exhibit Distinct Roles in Craniofacial Development. *Developmental Dynamics* 233: 1405-1418.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Andreasen E.A., Spitsbergen J.M., Tanguay R.L., Stegeman J.J., Heideman W. y Peterson R.E. 2002. Tissue-specific expression of *AHR2*, *ARNT2*, and *CYP1A* in zebrafish embryos and larvae: effects of developmental stage and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure. *Toxicol. Sci.* 68: 403-419.
- Andreazzoli M., Broccoli V. y Dawid I.B. 2001. Cloning and expression of *noz1*, a zebrafish zinc finger gene related to *Drosophila noca*. *Mechanisms of Development* 104: 117-120.
- Angelini D.R. y Kaufman T.C. 2005. Insect appendages and comparative ontogenetics. *Dev. Biol.* 286: 57-77.
- Arendt D. y Wittbrodt J. 2001. Reconstructing the eyes of *Urbilateria*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356: 1545-1563.
- Arendt D., Raible F., Denes A., Steinmetz P., Bakalenko N., Cunningham C., Klaus S., Novikova E., Shurygina E., Tessmar K. y Zelada F. 2003. *Platynereis dumerilii*, an Ancestral Molecular Model System for the Study of Evolution and Development. *EMBL Research Reports* pp. 64-68.
- Awasaki T. y Kimura K. 2001. Multiple function of *poxn* gene in larval PNS development and in adult appendage formation of *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* 211: 20-29.
- Azpiazu N. y Morata G. 2002. Distinct functions of homothorax in leg development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 119: 55-67.
- Bakkers J., Hild M., Kramer C., Furutani-Seiki M. y Hammerschmidt M. 2002. Zebrafish Δ Np63 Is a Direct Target of Bmp Signaling and Encodes a Transcriptional Repressor Blocking Neural Specification in the Ventral Ectoderm. *Developmental Cell* 2: 617-627.
- Balavoine G. y Adoutte A. 2003. The Segmented Urbilateria: A Testable Scenario. *Integr. Comp. Biol.* 43:137-147.
- Barabasi A.L. y Albert R. 1999. Emergence of scaling in random networks. *Science.* 286: 509-512.
- Beck C.W., Whitman M. y Slack J.M.W. 2001. The Role of BMP Signaling in Outgrowth and Patterning of the *Xenopus* Tail Bud. *Developmental Biology* 238: 303-314.
- Beermann A. y Schröder R. 2004. Functional stability of the *aristaless* gene in appendage tip formation during evolution. *Dev. Genes Evol.* 214: 303-308.
- Beermann A., Aranda M. y Schröder R. 2004. The *Sp8* zinc-finger transcription factor is involved in allometric growth of the limbs in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development* 131: 733-742.
- Begemann G., Gibert Y., Meyer A. y Ingham P.W. 2002. Cloning of zebrafish T-box genes *tbx15* and *tbx18* and their expression during embryonic development. *Mechanisms of Development* 114: 137-141.
- Bhanot P., Fish M., Jemison J.A., Nusse R., Nathans J. y Cadigan K.M. 1999. Frizzled and DFrizzled-2 function as redundant receptors for Wingless during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126: 4175-4186.

- Bienz M. 2005. *beta-Catenin*: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol.* 15: R64-R67.
- Bishop S.A., Klein T., Martinez A. y Couso J.P. 1999. Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development* 126: 2993-3003.
- Bornemann D.J., Duncan J.E., Staatz W., Selleck S. y Warrior R. 2004. Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* 131: 1927-1938.
- Bornholdt S. 2001. Modeling Genetic Networks and Their Evolution: A Complex Dynamical Systems Perspective. *Biol. Chem.*, 382: 1289-1299.
- Bornholdt S. y Sneppen K. 2000. Robustness as an evolutionary principle. *Proc. Biol. Sci.* 267: 2281-2286.
- Bromham L. y Penny D. 2003. The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics* 4: 216-224.
- Brown S. y Castelli-Gair Hombria J. 2000. *Drosophila grain* encodes a GATA transcription factor required for cell rearrangement during morphogenesis. *Development* 127: 4867-4876.
- Brulfert A., Monnot M. y Géraudie J. 1998. Expression of two Even-skipped genes *eve 1* and *evx2* during zebrafish fin morphogenesis and their regulation by retinoic acid. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 1117-1124.
- Buckles G.R., Rauskolb C., Lee Villano J. y Katz F.N. 2001. *four-jointed* interacts with *dachs*, *abelson* and *enabled* and feeds back onto the Notch pathway to affect growth and segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* 128: 3533-3542.
- Burke R., Nellen D., Bellotto M., Hafen E., Senti K., Dickson B.J. y Basler K. 1999. Dispatched, a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells. *Cell* 99: 803-815.
- Cadwallader A.B. y Yost H.J. 2006. Combinatorial Expression Patterns of Heparan Sulfate Sulfotransferases in Zebrafish: I. The 3-O-Sulfotransferase Family. *Developmental Dynamics* 235: 3423-3431.
- Cadwallader A.B. y Yost H.J. 2006. Combinatorial Expression Patterns of Heparan Sulfate Sulfotransferases in Zebrafish: II. The 6-O-Sulfotransferase Family. *Developmental Dynamics* 235: 3432-3437.
- Cadwallader A.B. y Yost H.J. 2007. Combinatorial Expression patterns of Heparan Sulfate Sulfotransferases in Zebrafish: III. 2-O-Sulfotransferase and C5- Epimerases. *Developmental Dynamics* 236: 581-586.
- Campbell G. 2002. Distalization of the *Drosophila* leg by graded EGF-receptor activity. *Nature* 418: 781-785.
- Campbell G. 2005. Regulation of gene expression in the distal region of the *Drosophila* leg by the *Hox11* homolog, *C15*. *Developmental Biology* 278: 607-618.
- Campbell G. y Tomlinson A. 1998. The roles of the homeobox genes *aristales* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development* 125: 4483-4493.
- Campbell G.L. y Tomlinson A. 2000. Transcriptional regulation of the Hedgehog effector *CI* by the zinc-finger gene *combgap*. *Development* 127: 4095-4103.
- Capdevila J. y Johnson R. L. 2000. Hedgehog signaling in vertebrate and invertebrate limb patterning. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1682-1694.
- Casares F. y Mann R.S. 1998. Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392: 723-726.
- Casares F. y Mann R.S. 2001. The Ground State of the Ventral Appendage in *Drosophila*. *Science* 293: 1477-1480.
- Cecchi M. C., Guerrero-Bosagna C. y Mpodozis J. 2001. El ¿delito? de Aristóteles. *Rev. chil. hist. nat.* 74: 507-514.
- Chen C. y Struhl G. 1999. Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of *Drosophila*. *Development* 126: 5441-5452.
- Chen W., Burgess S. y Hopkins N. 2001. Analysis of the zebrafish *smoothened* mutant reveals conserved and divergent functions of hedgehog activity. *Development* 128: 2385-2396.
- Cheung H.O., Zhang X., Ribeiro A., Mo R., Makino S., Puvion-Dran V., Law K.K., Briscoe J. y Hui C.C. 2009. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Sci. Signal.* 2: ra29.

- Claret S., Sanial M. y Plessis A. 2007. Evidence for a Novel Feedback Loop in the Hedgehog Pathway Involving Smoothened and Fused. *Current Biology* 17: 1326-1333.
- Coates M.I. 2003. The evolution of paired fins. *Theory Bisci.* 122: 266-287.
- Coates M.I. y Cohn M.J. 1998. Fins, limbs, and tails: outgrowths and axial patterning in vertebrate evolution *BioEssays* 20: 371-381.
- Collins R.T. y Cohen S.M. 2003. The secret life of Smoothened. *Dev Cell.* 5: 823-824.
- Colombo A., Reig G., Mione M., Concha M.L. 2006. Zebrafish *BarH-like* genes define discrete neural domains in the early embryo. *Gene Expression Patterns* 6: 347-352.
- Couso J.P. y Bishop S.A. 1998. Proximo-distal development in the legs of *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 345-352.
- Coyne J.A. 2006. Comment on "Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans". *Science.* 313: 761.
- Cresko W.A., Yan Y., Baltrus D.A., Amores A., Singer A., Rodríguez-María A. y Postlethwai J.H. 2004. Genome Duplication, Subfunction Partitioning, and Lineage Divergence: *Sox9* in Stickleback and Zebrafish. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 228: 480-489.
- Croushore J.A., Blasiolo B., Riddle R.C., Thisse C., Thisse B., Canfield V.A., Robertson G.P., Cheng K.C. y Levenson R. 2005. *ptena* and *ptenb* Genes Play Distinct Roles in Zebrafish Embryogenesis. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 234: 911-921.
- Davidson E.H. y Erwin D.H. 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science.* 311: 796-800.
- De Beer, G. (1971) Homology, an unsolved problem. Oxford University Press, Oxford. pp. 3-16
- De Robertis E.M. 2006. Evo-Devo: Variations on ancestral Themes. *Cell* 132:185-195.
- De Robertis E.M. y Sasai Y. 1996. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380: 37-40.
- Diaz-Benjumea F.J. y Cohen S.M. 1994. *wingless* acts through the *shaggy/zeste-white 3* kinase to direct dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* leg. *Development* 120: 1661-1670.
- Dong P.D.S., Chu J. y Panganiban G. 2000. Coexpression of the homeobox genes *Distal-less* and *homothorax* determines *Drosophila* antennal identity. *Development* 127: 209-216.
- Draper B.W., Stock D.W. y Kimmel C.B. 2003. Zebrafish *fgf24* functions with *fgf8* to promote posterior mesodermal development. *Development* 130: 4639-4654.
- Duncan D.M., Burgess E.A. y Duncan I. 1998. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by *spineless-aristopedia*, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev.* 12:1290-1303.
- Eisenberg L.M., Ingham P.W. y Brown A.M. 1992. Cloning and characterization of a novel *Drosophila* Wnt gene, *Dwnt-5*, a putative downstream target of the homeobox gene *distal-less*. *Dev Biol.* 154: 73-83.
- Emerald B.S. y Cohen S.M. 2004. Spatial and temporal regulation of the homeotic selector gene *antennapedia* is required for the establishment of leg identity in *Drosophila*. *Developmental Biology* 267: 462-472.
- Endler J.A. 1986. *Natural Selection in the Wild.* Princeton University Press
- Erkner A., Gallet A., Angelats C., Fasano L. y Kerridge S. 1999. The Role of Teashirt in Proximal Leg Development in *Drosophila*: Ectopic teashirt Expression Reveals Different Cell Behaviours in Ventral and Dorsal Domains. *Developmental Biology* 215: 221-232.
- Erwin D. H. y Davidson E. H. 2002. The last common bilaterian ancestor. *Development* 129: 3021-3032.
- Erwin D.H. 2000. Macroevolution is more than repeated rounds of microevolution. *Evol. Dev.* 2: 78-84.
- Erwin D.H. 2006. The Developmental Origins of Animal Bodyplans. En Xiao S. y Kaufman A.J. (eds.), *Neoproterozoic Geobiology and Paleobiology*, pp. 159-197. U.S. Government
- Estella C. y Mann R.S. 2008. Logic of Wg and Dpp induction of distal and medial fates in the *Drosophila* leg. *Development* 135: 627-636.
- Estella C., Rieckhof G., Calleja M. y Morata G. 2003. The role of *buttonhead* and *Spl* in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*. *Development* 130, 5929-5941.
- Finkelstein R., Smouse D., Capaci T.M., Spradling A.C. y Perrimon N. 1990. The *orthodenticle* gene encodes a novel homeodomain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4: 1516-1527.

- Fischer S., Draper B. W. y Neumann C. J. 2003. The zebrafish *fgf24* mutant identifies an additional level of Fgf signaling involved in vertebrate forelimb initiation. *Development* 130: 3515-3524.
- Fischer S., Draper B.W. y Neumann C.J. 2003. The zebrafish *fgf24* mutant identifies an additional level of Fgf signaling involved in vertebrate forelimb initiation. *Development* 130: 3515-3524.
- Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y. y Postlethwait J. 1999. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics* 151: 1531-1545.
- Fraser H., Hirsh A., Steinmetz L., Scharfe C. y Feldman M. 2002. Evolutionary rate in the protein interaction network. *Science* 296: 751-752.
- Fürthauer M., Reifers F., Brand M., Thisse B. y Thisse C. 2001. *sprouty4* acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development* 128: 2175-2186.
- Fürthauer M., Van Celst J., Thisse C. y Thisse B. 2004. Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 131: 2853-2864.
- Galant R. y Carroll S.B. 2002. Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* 415: 910-912.
- Galindo M.I., Bishop S.A. y Couso J.P. 2005. Dynamic EGFR-Ras Signalling in *Drosophila* Leg. *Development*. *Developmental Dynamics* 233: 1496-1508.
- Galindo M.I., Bishop S.A., Greig S. y Couso J.P. 2002. Leg Patterning Driven by Proximal-Distal Interactions and EGFR Signaling. *Science* 297: 256-259.
- Garrity D.M., Childs S. y Fishman M.C. 2002. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin *Tbx5* deficiency syndrome. *Development* 129, 4635-4645.
- Géraudie J. 1995. Fin buds, limb buds, similar types of buds? *GEOBIOS* 19: 249-254.
- Gibert Y., Gajewski A., Meyer A. y Begemann G. 2006. Induction and pre patterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development* 133: 2649-2659.
- Gilbert S. F. (2003) Cell-cell communication in development, The genetics of axis specification in *Drosophila*. En. Andrew D. Sinauer. ed. *Developmental Biology*. Séptima Edición. pp. 154-163, 269. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Gilbert S.F., Opitz J.M. y Raff R.A. 1996. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Dev Biol* 173: 357-372.
- Gillis J.A., Dahn R.D., Shubin N.H. 2009. Shared developmental mechanisms pattern the vertebrate gill arch and paired fin skeletons. *PNAS* 106: 5720-5724.
- Goishi K., Lee P., Davidson A.J., Nishi E., Zon L.I. y Klagsbrun M. 2003. Inhibition of zebrafish epidermal growth factor receptor activity results in cardiovascular defects. *Mechanisms of Development* 120: 811-822.
- Goldman D.C., Martin G.R. y Tam PPL. 2000. Fate and function of the ventral ectodermal ridge during mouse tail Development. *Development* 127: 2113-2123.
- González-Crespo S. y Morata G. 1996. Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* 122: 3921-3928.
- Grandel H. y Schulte-Merker S. 1998. The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*) *Mech. Dev.* 79: 99-120.
- Grandel H., Draper B. W. y Schulte-Merker S. 2000. *dackel* acts in the ectoderm of the zebrafish pectoral fin to maintain AER signaling. *Development* 127: 4169-4178.
- Greco T.L., Takada S., Newhouse M.M., McMahon J.A., McMahon A.P. y Camper S.A. 1996. Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that *Wnt-3a* gene dosage regulates mouse axial development. *Genes & Development* 10:313-324.
- Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C. y Gelbart W.M. 2005. Chromosome Mutation II: Changes in Chromosome number; Mechanisms of Gene mutation. En: An introduction to genetic analysis. 8th ed. pp. 499, 556-572. W. H. Freeman, New York.
- Guha U., Gomes W.A., Kobayashi T., Pestell R.G. y Kessler J.A. 2002. In Vivo Evidence That BMP Signaling Is Necessary for Apoptosis in the Mouse Limb. *Developmental Biology* 249: 108-120.
- Guimerà R. y Nunes Amaral L.A. 2005. Cartography of complex networks: modules and universal roles. *J Stat Mech.* P02001: P02001-1-P02001-13.
- Hahn M., Conant G. y Wagner A. 2004. Molecular evolution in large genetic networks: Does connectivity equal constraint? *J. Mol. Evol.* 58: 203-211.

- Halder G., Callaerts P. y Gehring W.J. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science*. 267:1788-1792.
- Hall B.K. 2000. Balfour, Garstang and de Beer: The First Century of Evolutionary Embryology. *AMER. ZOOL.*, 40:718-728.
- Hammond K.L., Hill R.E., Whitfield T.T. y Currie P.D. 2002. Isolation of three zebrafish *dachshund* homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mechanisms of Development* 112: 183-189.
- Hammond K.L., Loynes H.E., Mowbray C., Runke G., Hammerschmidt M., Mullins M.C., Hildreth V., Chaudhry B. y Whitfield T.T. 2009. A late role for *bmp2b* in the morphogenesis of semicircular canal ducts in the zebrafish inner ear. 4: e4368.
- Han C., Belenkaya T.Y., Khodoun M., Tauchi M., Lin X. y Lin X. 2004. Distinct and collaborative roles of *Drosophila* EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation. *Development* 131: 1563-1575.
- Hao I., Green R.B., Dunaevsky O., Lengyel J.A., y Rauskolb C. 2003. The odd-skipped family of zinc finger genes promotes *Drosophila* leg segmentation. *Developmental Biology* 263: 282-295.
- Harduf H., Halperin E., Reshef R. y Ron D. 2005. Sef Is Synexpressed With FGFs During Chick Embryogenesis and Its Expression Is Differentially Regulated by FGFs in the Developing Limb. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 233: 301-312.
- Harvey R. P., 1996. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev. Biol.* 178: 203-216.
- Harvey S.A. y Logan M.P.O. 2006. *sall4* acts downstream of *tbx5* and is required for pectoral fin outgrowth. *Development* 133: 1165-1173.
- Hatta K., Bremiller R., Westerfield M. y Kimmel C.B. 1991. Diversity of expression of *engrailed*-like antigens in zebrafish. *Development* 112: 821-832.
- Haun C., Alexander J., Stainier D. Y. y Okkema P. G. 1998. Rescue of *Caenorhabditis elegans* pharyngeal development by a vertebrate heart specification gene. *PNAS* 95: 5072-5075
- Hays R., Buchanan K.T., Neff C. y Orenic T.V. 1999. Patterning of *Drosophila* leg sensory organs through combinatorial signaling by Hedgehog, Decapentaplegic and Wingless. *Development* 126: 2891-2899.
- Herke S.W., Serio N.V. y Rogers B.T. 2005. Functional analyses of *tiptop* and *antennapedia* in the embryonic development of *Oncopeltus fasciatus* suggests an evolutionary pathway from ground state to insect legs. *Development* 132: 27-34.
- Herpin A., Lelong C., Becker T., Rosa F., Favrel P. y Cunningham C, 2005. Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *FEBS Journal* 272: 3424-3440.
- Heslip T.R., Theisen H., Walker H. y Lawrence Marsh J. 1997. SHAGGY and DISHEVELLED exert opposite effects on wingless and decapentaplegic expression and on positional identity in imaginal discs. *Development* 124: 1069-1078.
- Hinman V.F. y Davidson E.H. 2007. Evolutionary plasticity of developmental gene regulatory network architecture. *PNAS* 104:19404-19409.
- Hoffman L., Miles J., Avaron F., Laforest L. y Akimenko M. 2002. Exogenous retinoic acid induces a stage-specific, transient and progressive extension of Sonic hedgehog expression across the pectoral fin bud of Zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 949-956.
- Huangfu D. y Anderson K.V. 2006. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 133: 3-14.
- Hurst L. y Smith N. 1999. Do essential genes evolve slowly? *Current Biology* 9: 747-750.
- Inaki M., Kojima T., Ueda R. y Saigo K. 2002. Requirements of high levels of Hedgehog signaling activity for medialregion cell fate determination in *Drosophila* legs: identification of *pxb*, a putative Hedgehog signaling attenuator gene repressed along the anterior-posterior compartment boundary. *Mechanisms of Development* 116: 3-18.
- Iovine M.K. 2007. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins. *Nature Chemical Biology* 3: 613-618
- Izumikawa T., Egusa N., Taniguchi F., Sugahara K. y Kitagawa H. 2006. Heparan Sulfate Polymerization in *Drosophila*. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 1929-1934.

- Janvier, P. 1996a. The dawn of the vertebrates: Characters versus common ascent in the rise of current vertebrate phylogenies. *Palaeontology* 39: 259-288.
- Janvier, P. 1996b. Early vertebrates. Oxford University Press., Oxford
- Jia J., Amana K., Wang G., Tang J., Wang B. y Jiang J. 2002. Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. *NATURE* 416: 548-525.
- Jiang J. y Struhl G. 1995. Protein Kinase A and Hedgehog Signaling in *Drosophila* Limb Development. *Cell*. 80: 563-572.
- Jovelin R., He X., Amores A., Yan Y., Shi R., Qin B., Roe B., Cresko W.A., Postlethwait. 2007. Duplication and Divergence of *fgf8* Functions in Teleost Development and Evolution. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 308B: 730-743.
- Junker B.H. 2008. Networks in Biology; Potatov A.P. 2008. Signal transduction and gene regulatory networks. En Junker B.H. y Schreiber F. (eds) *Analysis of Biological Networks*. pp. 3-12, 186. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Kandel E.R, Schwartz J.H. y Jessell T.M. 2000. The guidance of axons to their targets. En: *Principles of neural science*. 4ta ed. McGraw-Hill, New York.
- Kanehisa M. y Goto S. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28: 27-30.
- Kardong K.V. 1999. Sistema Esquelético: El esqueleto apendicular. En *Vertebrados . Anatomía Comparada, Función, Evolución*. pp. 3001-304. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Karlstrom R.O., Tyurina O.V., Kawakami A., Nishioka N., Talbot W.S., Sasaki H. y Schier A.F. 2003. Genetic analysis of zebrafish *gli1* and *gli2* reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development* 130: 1549-1564.
- Kauffman S. 2008. Complexity and Genetic Networks. *Work*. 1-15
- Kawakami Y., Rodríguez Esteban C., Matsui T., Rodríguez-León J., Kato S. y Izpisua Belmonte J.C. 2004. *Sp8* and *Sp9*, two closely related *buttonhead-like* transcription factors, regulate *Fgf8* expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* 131: 4763-4774.
- Kawakami Y., Rodríguez-León J., Koth C.M., Büscher D., Itoh T., Raya A., Ng J.K., Rodríguez Esteban C., Takahashi S., Henrique D., Schwarz M., Asahara H. y Izpisua Belmonte J.C. 2003. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *NATURE Cell Biology* 5: 513-519.
- Kelly G.M., Erezylmaz D.F. y Moon R.T. 1995a. Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of β -*catenin*. *Mech. Dev.* 53: 261-273.
- Kida Y., Maeda Y., Shiraishi T., Suzuki T. y Ogura T. 2004. Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development* 131: 4179-4187.
- Kim S., Shin J., Park H., Yeo S., Hong S., Han S., Rhee M., Kim C., Chitnis A.B. y Huh T. 2002. Specification of an anterior neuroectoderm patterning by *frizzled8a*-mediated *Wnt8b* signalling during late gastrulation in zebrafish. *Development* 129: 4443-4455.
- Kishimoto Y., Lee K., Zon L., Hammerschmidt M. y Schulte-Merker S. 1997. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* 124: 4457-4466.
- Klein T. y Campos-Ortega J.A. 1997. *klumpfuss*, a *Drosophila* gene encoding a member of the EGR family of transcription factors, is involved in bristle and leg development. *Development* 124: 3123-3134.
- Kojima T. 2004. The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Develop. Growth Differ.* 46: 115-129.
- Kojima T., Sato M. y Saigo K. 2000. Formation and specification of distal leg segments in *Drosophila* by dual *Bar* homeobox genes, *BarH1* and *BarH2*. *Development* 127: 769-778.
- Kojima T., Tsuji T. y Saigo K. 2005. A concerted action of a paired-type homeobox gene, *aristaleless*, and a homolog of *Hox11/ilx* homeobox gene, *clawless*, is essential for the distal tip development of the *Drosophila* leg. *Developmental Biology* 279: 434-445.
- Koski L.B. y Golding G.B. 2001. The Closest BLAST Hit Is Often Not the Nearest Neighbor. *J. Mol. Evol.* 52: 540-542.
- Koudijs M.J., den Broeder M.J., Groot E. y van Eeden F.J. 2008. Genetic analysis of the two zebrafish *patched* homologues identifies novel roles for the hedgehog signaling pathway. *BMC Dev. Biol.* 8: 15.

- Koudijs M.J., den Broeder M.J., Keijser A., Wienholds E., Houwing S., van Rooijen E.M.H.C., Geisler R. y van Eeden F.J.M. 2005. The Zebrafish Mutants *dre*, *uki*, and *lep* Encode Negative Regulators of the Hedgehog Signaling Pathway. *PLoS Genet.* 1: 223-234.
- Kozu S., Tajiri R., Tsuji T., Michiue T., Saigo K. y Kojima T. 2006. Temporal regulation of late expression of *Bar* homeobox genes during *Drosophila* leg development by *Spineless*, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Developmental Biology* 294: 497-508.
- Kubota K., Goto S. y Hayashi S. 2003. The role of Wg signaling in the patterning of embryonic leg primordium in *Drosophila*. *Developmental Biology* 257: 117-126.
- Kukulová-Peck J. 1991. Fossil history and the evolution of hexapod structures. En: *The Insects of Australia*, 2da ed., Vol. 1, pp. 141-179. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Kwon C., Hays R., Fetting J. y Orenic T.V. 2004. Opposing inputs by Hedgehog and Brinker define a stripe of hairy expression in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* 131: 2681-2692.
- Kyoda K. y Kitano H. 1999. Simulation of genetic interaction for *Drosophila* leg formation. *Pac.Symp. Biocomput.* 4: 77-89.
- Labandeira C.C., Beall B.S., y Hueber F.M. 1988. Early insect diversification: Evidence from a Lower Devonian bristletail from Québec. *Science* 242: 913-916.
- Langenau D.M., Palomero T., Kanki J.P., Ferrando A.A., Zhou Y., Zon L.I. y Look A.T. 2002. Molecular cloning and developmental expression of *Tlx* (*Hox11*) genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Mechanisms of Development* 117: 243-248.
- Laubichler M. 2000. Homology in Development and the Development of the Homology Concept. *Amer. Zool.* 40:777-788
- Lecuit T. y Cohen S.M. 1997. Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* 388: 139-145.
- Lee B.C. y Roy S. 2006. *Blimp-1* is an essential component of the genetic program controlling development of the pectoral limb bud. *Dev. Biol.* 300, 623-634.
- Lee H., Khan R. y O'Keefe M. 2008. Aniridia: current pathology and management. *Acta Ophthalmol.* 86:708-715.
- Lee J., von der Hardt S., Rusch M.A., Stringer S.E., Stickney H.L., Talbot W.S., Geisler R., Nüsslein-Volhard C., Selleck S.B., Chien C y Roehl H. 2004. Axon Sorting in the Optic Tract Requires HSPG Synthesis by *ext2* (*dackel*) and *extl3* (*boxer*). *Neuron* 44: 947-960.
- Lepage T., Cohen S.M., Diaz-Benjumea F.J. y Parkhurst S.M. 1995. Signal transduction by cAMP-dependent protein kinase A in *Drosophila* limb patterning. *Nature* 373: 711-715.
- Leroi A.M. 2000. The scale independence of evolution. *Evol. Dev.* 2: 67-77.
- Letsou A., Arora K., Wrana J.L., Simin K., Twombly V., Jamal J., Staehling-Hampton K., Hoffmann G.F.M., Gelbart W.M., Massagu J. y D'Connop M.B. 1995. *Drosophila* Dpp Signaling Is Mediated by the *punt* Gene Product: A Dual Ligand-Binding Type II Receptor of the TGFP Receptor Family. *Cell* 80: 899-908.
- Lichtneckert R. y Reichert H. 2005. Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* 94: 465-477.
- Lin H.V., Doroquez D.V., Cho S., Chen F., Rebay I. y Cadigan K.M. 2003. *Splits ends* is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development* 130: 3125-3135.
- Lin X., Rinaldo L., Fazly A.F. y Xu X. 2007. Depletion of *Med10* enhances Wnt and suppresses Nodal signaling during zebrafish embryogenesis. *Developmental Biology* 303: 536-548.
- Liolios K., Mavrommatis K., Tavernarakis N. y Kyripides N.C. 2007. The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata.
- Longabaugh W.J., Davidson E.H. y Bolouri H. 2005. Computational representation of developmental genetic regulatory networks. *Dev. Biol.* 283: 1-16.
- Lowe C.J., Wu M., Salic A., Evans L., Lander E., Stange-Thomann N., Gruber C.E., Gerhart J., Kirschner M. 2004. Anteroposterior Patterning in Hemichordates and the Origins of the Chordate Nervous System. *Cell*, 113: 853-865.
- Lu C., Rincón-Limas D.E. y Botas J. 2000. Conserved overlapping and reciprocal expression of *msh/Msx1* and *apterous/Lhx2* in *Drosophila* and mice. *Mechanisms of Development* 99: 177-181.
- Lum L. y Beachy P.A. 2004. The Hedgehog Response Network: Sensors, Switches, and Routers. *Science* 304: 1755-1759.

- Manfroid I., Delporte F., Baudhuin A., Motte P., Neumann C.J., Voz M.L., Martial J.A. y Peers B. 2007. Reciprocal endoderm-mesoderm interactions mediated by *fgf24* and *fgf10* govern pancreas development. *Development* 134: 4011-4021.
- Marshall C.R. 2006. Explaining the Cambrian "Explosion" of Animals. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 34: 355-384
- Mathew L.K., Andreasen E.A. y Tanguay R.L. 2006. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Inhibits Regenerative Growth. *Mol Pharmacol* 69:257-265.
- Maves L. y Schubiger G. 1998. A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling. *Development* 125: 115-124.
- Mercader N. 2007. Early steps of paired fin development in zebrafish compared with tetrapod limb development *Develop. Growth Differ.* 49: 421-437.
- Mercader N., Fischer S. y Neumann C.J. 2006. *Prdm1* acts downstream of a sequential RA, Wnt and Fgf signaling cascade during zebrafish forelimb induction. *Development* 133: 2805-2815.
- Milán M. 2007. Sculpting a fly leg: BMP boundaries and cell death *Nature Cell Biology* 9: 17-18.
- Milán M., Weihe U., Tiong S., Bender W. y Cohen S.M. 2001. *msh* specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development* 128: 3263-3268.
- Milétič I. y Limbourg-Bouchon B. 2000. *Drosophila* null *slimb* clones transiently deregulate Hedgehog independent transcription of *wingless* in all limb discs, and induce decapentaplegic transcription linked to imaginal disc regeneration. *Mechanisms of Development* 93: 15-26.
- Miller R.F., Cloutier R. y Turner S. 2003. The oldest articulated chondrichthyan from the Early Devonian period. *Nature* 425: 501-504.
- Minelli A. 2000. Limbs and tail as evolutionarily diverging duplicates of the main body axis. *Evol. Dev.* 2: 157-165.
- Minelli A. 2003. The origin and evolution of appendages. *Int. J. Dev. Biol.* 47: 573-581
- Miura H., Yanazawa M., Kato K. y Kitamura K. 1997. Expression of a novel *aristaleless* related homeobox gene '*Arx*' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. *Mechanisms of Development* 65: 99-109.
- Moczek A.P. 2006. Integrating micro- and macroevolution of development through the study of horned beetles. *Heredity.* 97:168-178.
- Nagaso H., Suzuki A., Tada M. y Ueno N. 1999. Dual specificity of activin type II receptor *ActRIIb* in dorso-ventral patterning during zebrafish embryogenesis. *Develop. Growth Differ.* 41: 119-133.
- Nagayoshi S., Hayashi E., Abe G., Osato N., Asakawa K., Urasaki A., Horikawa K., Ikee K., Takeda H., y Kawakami K., 2008. Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*. *Development* 135: 159-169.
- Neumann C.J., Grandel H., Gaffield W., Schulte-Merker S. Nüsslein-Volhard C. 1999. Transient establishment of anteroposterior polarity in the zebrafish pectoral fin bud in the absence of sonic hedgehog activity. *Development* 126: 4817-4826.
- Ng J.K., Kawakami Y., Büscher D., Raya A., Itoh T., Koth C.M., Rodríguez Esteban C., Rodríguez-León J., Garrity D.M., Fishman M.C. y Izpisua Belmonte J.C. 2002. The limb identity gene *Tbx5* promotes limb initiation by interacting with *Wnt2b* and *Fgf10*. *Development* 129: 5161-5170.
- Nicholas J.C. y Currie P.D. 2007. Insights From Sharks: Evolutionary and Developmental Models of Fin Development. *Dev. Dyn.* 236: 2421-2431.
- Nikaido M., Tada M., Takeda H., Kuroiwa A. y Ueno N. 1999. In vivo analysis using variants of zebrafish BMPR-IA: range of action and involvement of BMP in ectoderm patterning. *Development* 126: 181-190.
- Niswander L. 2003. Pattern Formation: Old Models Out On a Limb. *Nature Reviews* 4: 131-141.
- Nomura R., Kamei E., Hotta Y., Konishi M., Miyake A. y Itoh N. 2006. *Fgf16* is essential for pectoral fin bud formation in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 340-346.
- Norton W.H., Ledin J., Grandel H. y Neumann C.J. 2005. HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. *Development* 132, 4963-4973.
- Nusse R. 2003. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130: 5297-5305.
- O'Rourke M.P. y Tam P.P.L. 2002. *Twist* functions in mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 401-413.

- Ochi H., Pearson B.J., Chuang P., Hammerschmidt M. y Westerfield M. 2006. Hhip regulates zebrafish muscle development by both sequestering Hedgehog and modulating localization of Smoothed. *Developmental Biology* 297: 127-140.
- Olson E.N. 2006. Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. *Science* 313: 1922-1927.
- Pál C., Papp B. y Hurst L. 2001. Highly expressed genes in yeast evolve slowly. *Genetics* 158: 927-931.
- Pál C., Papp B. y Hurst L. 2003. Rate of evolution and gene dispensability. *Nature* 421: 496-497.
- Panganiban G., Irvine S. M., Lowe C., Roehl H., Corley L. S., Sherbon B., Grenier J.K., Fallon J.F., Kimble J., Walker M., Wray G. A., Swalla B.J., Martindale M.Q., y Carroll S.B. (1997) The origin and evolution of animal appendages. *PNAS* 94: 5162-5166.
- Pearse II R.V., Collier L.S., Scott M.P. y Tabin C.J. 1999. Vertebrate Homologs of *Drosophila* Suppressor of Fused Interact with the Gli Family of Transcriptional Regulators. *Developmental Biology*. 212: 323-336.
- Penton A. y Hoffmann F.M. 1996. Decapentaplegic restricts the domain of wingless during *Drosophila* limb patterning. *Nature* 382: 162-165.
- Plaster N., Sonntag C., Schilling T.F. y Hammerschmidt M. 2007. REREa/Atrophia-2 Interacts With Histone Deacetylase and Fgf8 Signaling to Regulate Multiple Processes of Zebrafish Development. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 236: 1891-1904
- Pocock R., Mione M., Hussain S., Maxwell S., Pontecorvi M., Aslam S., Gerrelli D., Sowden J.C. y Woollard A. 2008. Neuronal function of Tbx20 conserved from nematodes to vertebrates. *Developmental Biology* 317: 671-685.
- Pöpperl H., Rikhof H., Chang H., Haffter P., Kimmel C.B., y Moens C.B. 2000. *lazarus* Is a Novel *pbx* Gene that Globally Mediates hox Gene Function in Zebrafish. *Molecular Cell* 6: 255-267.
- Potatov A.P. 2008. Signal transduction and gene regulatory networks. En Junker B.H. y Schreiber F. (eds) *Analysis of Biological Networks*. pp. 3-12, 186. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Power S.C., Lancman J. y Smith S.M. 1999. Retinoic Acid Is Essential for Shh/Hoxd Signaling During Rat Limb Outgrowth but Not for Limb Initiation. *Developmental Dynamics* 216: 469-480.
- Prpic N., Janssen R., Wigand B., Klingler M. y Damen W.G.M. 2003. Gene expression in spider appendages reveals reversal of *exd/hth* spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests divergent distal morphogen signaling. *Developmental Biology* 264: 119-140.
- Prykhodzhiy S.V. y Neumann C.J. 2008. Distinct roles of Shh and Fgf signaling in regulating cell proliferation during zebrafish pectoral fin development. *BMC Dev. Biol.* 8: 91.
- Pueyo J.I. y Couso J.P. 2005. Parallels between the proximal-distal development of vertebrate and arthropod appendages: homology without an ancestor? *Curr. Opin. Gen. Dev.* 15: 439-446.
- Pueyo J.I., Galindo M.I., Bishop S.A. y Couso J.P. 2000. Proximal-distal leg development in *Drosophila* requires the *apterous* gene and the *Lim1* homologue *dlim1*. *Development* 127: 5391-5402.
- Pueyo J.P. y Couso J.P. 2004. Chip-mediated partnerships of the homeodomain proteins Bar and Aristaless with the LIM-HOM proteins Apterous and Lim1 regulate distal leg development. *Development* 131: 3107-3120.
- Quint E., Zerucha T. y Ekker M. 2000. Differential Expression of Orthologous *Dlx* Genes in Zebrafish and Mice: Implications for the Evolution of the *Dlx* Homeobox Gene Family. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 288: 235-241.
- Quiring R., Walldorf U., Kloter U., Gehring W.J. 1994. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265: 785-789.
- Raff R.A. 2007. Written in stone: fossils, genes and evo-devo. *Nature*. 8: 911-920.
- Raff R.A., Wallace A., Carroll S.B. Coates M., Wray G. 1999. Chronicling the birth of a discipline. *Evol. Dev.* 1: Editorial.
- Raftery L.A. y Sutherland D.J. 1999. TGF- β Family Signal Transduction in *Drosophila* Development: From Mad to Smads. *Developmental Biology* 210: 251-268.
- Reifers F., Böhli H., Walsh E.C., Crossley P.H., Stainier D.Y.R. y Brand M. 1998. Fgf8 is mutated in zebrafish *acerebellar* (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* 125: 2381-2395.

- Rothschild S.C., Easley IV C.A., Francescato L., Lister J.A., Garrity D.M. y Tombes R.M. 2009. Tbx5-mediated expression of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is necessary for zebrafish cardiac and pectoral fin morphogenesis. *Dev. Biol.* 330: 175-184.
- Ruppert E.E. y Barnes R.D. 1996. Introducción a los artrópodos. En: *Zoología de los Invertebrados*. pp. 601-604. McGraw-Hill Interamericana. México D.F.
- Ruvinsky I., Oates A.C., Silver L.M. y Ho R.K. 2000. The evolution of paired appendages in vertebrates: T-box genes in the zebrafish. *Dev. Genes Evol.* 210: 82-91.
- Salathé M., Ackermann M. y Bonhoeffer S. 2006. The effect of multifunctionality on the rate of evolution in yeast. *Mol. Biol. Evol.* 23:721-722.
- Sánchez-Herrero E., Couso J.P., Capdevila J. y Guerrero I. 1996. The *fu* gene discriminates between pathways to control dpp expression in *Drosophila* imaginal discs. *Mechanisms of Development* 55: 159-170.
- Sanetra M., Begemann G., Becker M. y Meyer A. 2005. Conservation and co-option in developmental programmes: the importance of homology relationships. *Frontiers in Zoology* 2: 15.
- Sansom I.J., Smith M.M. y Smith, M.P. 1996. Scales of thelodont and shark-like fishes from the Ordovician of Colorado. *Nature* 379: 628-630.
- Schlosser G. y Thieffry D. 2000. Modularity in development and evolution. *Bioessays* 22: 1043-1045.
- Schweizer L. y Varmus H. 2003. Wnt/Wingless signaling through beta-catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biol.* 4: 4.
- Serrano N. y O'Farrell P.H. 1997. Limb morphogenesis: connections between patterning and growth. *Curr. Biol.* 7: R186-R195.
- Seth A., Culverwell J., Walkowicz M., Toro S., Rick J.M., Neuhaus S.C.F., Varga Z.M. y Karlstrom R.O. 2006. *belladonna/lhx2* is required for neural patterning and midline axon guidance in the zebrafish forebrain. *Development* 133: 725-735.
- Shinmyo Y., Mito T., Uda T., Nakamura T., Miyawaki K., Ohuchi H. y Noji S. 2006. *brachyenteron* is necessary for morphogenesis of the posterior gut but not for anteroposterior axial elongation from the posterior growth zone in the intermediate germ band cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development* 133, 4539-4547.
- Shu D., Luo H., Conway Morris S., Zhang X., Hu S., Chen L., Han J., Zhu M., Li Y. y Chen L. 1999. Lower Cambrian vertebrates from south China. *Nature* 402: 42-46.
- Shubin N., Tabin C., y Carroll S. 1997. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 388: 639-648.
- Si Dong P.D., Chu J. y Panganiban G. 2000. Coexpression of the homeobox genes *Distal-less* and *homothorax* determines *Drosophila* antennal identity. *Development* 127: 209-216.
- Siekman A.F. y Brand M. 2005. Distinct Tissue-Specificity of Three Zebrafish *ext1* Genes Encoding Proteoglycan Modifying Enzymes and Their Relationship to Somitic Sonic Hedgehog Signaling. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 232: 498-505.
- Simpson G.G. 1944. *Tempo and Mode in Evolution*. New York: Columbia Univ. Press.
- Sisson J.C., Ho K.S., Suyama K. y Scott M.P. 1997. Costal2, a Novel Kinesin-Related Protein in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell* 90: 235-245.
- Snodgrass R. 1935. *Principles of Insect Morphogenesis*. New York, London: McGraw Hill.
- Solomon E.P., Berg L.R. y Martin D.W. 2001. Especiación y Macroevolución. En: *Biología*. 5ta ed. pp. 413-415. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Sordino P. y Duboule D. 1996. A molecular approach to the evolution of vertebrate paired appendages. *TREE* 2: 114-119.
- Sordino P., Duboule D. y Kondo T. 1996. Zebrafish *Hoxa* and *EVX-2* genes: cloning, developmental expression and implications for the functional evolution of posterior Hox genes. *Mechanisms of Development* 59: 165-175.
- Soshnikova N., Zechner D., Huelsken J., Mishina Y., Behringer R.R., Taketo M.M., Crenshaw III E.E. y Birchmeier W. 2003. Genetic interaction between Wnt/ β -catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes & Development* 17:1963-1968.
- Stathopoulos A. y Levine M. 2005. Genomic regulatory networks and animal development. *Dev. Cell.* 9:449-462.

- Stollewerk A., Schoppmeier M. y Damen W.G.M. 2003. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *NATURE* 423: 863-865.
- Struhl G. 1981. A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* 292, 635-638.
- Svensden P.C., Marshall S.D.G, Kyba M. y Brook W.J. 2000. The *combgap* locus encodes a zinc-finger protein that regulates cubitus interruptus during limb development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 127: 4083-4093.
- Swalla B.J. 2006. Building divergent body plans with similar genetic pathways. *Heredity* 97: 235-243.
- Tabin C., Carroll S.B. y Panganiban G. 1999. Out on a Limb: Parallels in Vertebrate and Invertebrate Limb Patterning and the Origin of Appendages. *Amer. Zool.* 39: 650-663.
- Tajiri R., Tsuji T., Ueda R., Saigo K. y Kojima T. 2007. Fate determination of *Drosophila* leg distal regions by *trachealess* and *tango* through repression and stimulation, respectively, of *Bar* homeobox gene expression in the future pretarsus and tarsus. *Developmental Biology* 303: 461-473.
- Takei Y., Ozawa Y., Sato M., Watanabe A. y Tabata T. 2004. Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Development* 131: 73-82.
- Tamura K., Kuraishi R., Saito D., Masaki H., Ide H. y Yonei-Tamura S. 2001. Evolutionary aspects of positioning and identification of vertebrate limbs. *J Anat* 199: 195-204.
- Tay S.Y., Ingham P.W., y Roy S. 2005. A homologue of the *Drosophila* kinesin-like protein Costal2 regulates Hedgehog signal transduction in the vertebrate embryo. *Development* 132: 625-634.
- Tena J.J., Neto A., de la Calle-Mustienes E., Bras-Pereira C., Casares F., Gómez-Skarmeta J.L. 2007. *Odd-skipped* genes encode repressors that control kidney development. *Developmental Biology* 301: 518-531.
- The Gene Ontology Consortium. 2002. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25: 25-29.
- Theisen H., Syed A., Nguyen B.T., Lukacsovich T., Purcell J., Srivastava G.P., Iron D., Gaudenz K., Nie Q., Wan F.Y.M., Waterman M.L. y Marsh J.L. 2007. Wingless Directly Represses DPP Morphogen Expression via an Armadillo/TCF/Brinker Complex. *PLoS One.* 2: e142.
- Theodosiou N.A., Zhang S., Wang W. y Xu T. 1998. *slimb* coordinates *wg* and *dpp* expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development. *Development* 125: 3411-3416.
- Therond P., Busson D., Guillemet E., Limbourg-Bouchon B., Preat T., Terracol R., Tricoire H. y Lamour-Isnard C. 1993. Molecular organisation and expression pattern of the segment polarity gene *fused* of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 44: 65-80.
- Thisse B. y Thisse C. 2004. Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).
- Thisse C. y Thisse B. 2005. High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones. ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).
- Thorpe C.J., Weidinger G. y Moon R.T. 2005. Wnt/ β -catenin regulation of the *Sp1*-related transcription factor *sp5l* promotes tail development in zebrafish *Development* 132: 1763-1772.
- Tonou-Fujimori N., Takahashi M., Onodera H., Kikuta H., Koshida S., Takeda H. y Yamasu K. 2002. Expression of the *FGF receptor 2* gene (*fgfr2*) during embryogenesis in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene Expression Patterns* 2: 183-188.
- Toyama R., Kobayashi M., Tomita T. y Dawid I.B. 2000. Expression of LIM-domain binding protein (*ldb*) genes during zebrafish embryogenesis. *Mechanisms of Development* 71: 197-200.
- Tree of Life web site. 2009. Diptera. <http://tolweb.org/diptera>
- True J.R. y Haag E.S. 2001. Developmental system drift and flexibility in evolutionary trajectories. *Evol. Dev.* 3:109-119.
- Tsang M., Friesel R., Kudoh T. y Dawid I.B. 2002. Identification of *Sef*, a novel modulator of FGF signaling. *NATURE CELL BIOLOGY* 4: 165-169.
- Tsuji T., Sato A., Hiratani I., Taira M., Saigo K. y Kojima T. 2000. Requirements of *Lim1*, a *Drosophila* LIM-homeobox gene, for normal leg and antennal development. *Development* 127: 4315-4323.
- Tsuji T., Sato A., Hiratani I., Taira M., Saigo K. y Kojima T. 2000. Requirements of *Lim1*, a *Drosophila* LIM-homeobox gene, for normal leg and antennal development. *Development* 127: 4315-4323.
- Tümpel S., Sanz-Ezquerro J.J., Isaac A., Eblaghie M.C., Dobson J. y Tickle C. 2002. Regulation of *Tbx3* Expression by Anteroposterior Signalling in Vertebrate Limb Development. *Developmental Biology* 250: 251-262.

- Tyurina O.V., Guner B., Popova E., Feng J., Schier A.F., Kohtz J.D. y Karlstrom R.O. 2005. Zebrafish Gli3 functions as both an activator and a repressor in Hedgehog signaling. *Developmental Biology* 277: 537-556.
- Uemura O., Okada Y., Ando H., Guedj M., Higashijima S., Shimazaki T., Chino N., Okano H. y Okamoto H. 2005. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isll* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental Biology* 278: 587-606.
- van Eeden F.J., Granato M., Schach U., Brand M., Furutani-Seiki M., Haffter P., Hammerschmidt M., Heisenberg C.P., Jiang Y.J., Kane D.A., Kelsh R.N., Mullins M.C., Odenthal J., Warga R.M., Nüsslein-Volhard C. 1996. Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 123: 255-262.
- Vandersea M.W., Fleming P., McCarthy R.A. y Smith D.G. 1998. Fin duplications and deletions induced by disruption of retinoic acid signaling. *Dev. Genes Evol.* 208: 61-68.
- Varga Z.M., Amores A., Lewis K.E., Yan Y., Postlethwait J.H., Eisen J.S. y Westerfield M. 2001. Zebrafish *smoothened* functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development* 128: 3497-3509.
- Varjosalo M., Li S. y Taipale J. 2006. Divergence of Hedgehog Signal Transduction Mechanism between *Drosophila* and Mammals. *Developmental Cell* 10: 177-186.
- Veien E.S., Grierson M.J., Saund R.S., Dorsky R.I. 2005 Expression pattern of zebrafish *tcf7* suggests unexplored domains of Wnt/beta-catenin activity. *Dev. Dyn.* 233:233-239.
- Wagner A. 2003. How the global structure of protein interaction networks evolves. *Proc. Biol. Sci.* 270: 457-466
- Wagner G.P., Pavlicev M. y Cheverud J.M. 2007. The road to modularity. *Nature Reviews* 8: 921-931.
- Wakahara T., Kusu N., Yamauchi H., Kimura I., Konishi M., Miyake A., Itoh N. 2007. *Fibin*, a novel secreted lateral plate mesoderm signal, is essential for pectoral fin bud initiation in zebrafish. *Dev. Biol.* 303: 527-535.
- Wall D., Hirsh A., Fraser H., Kumm J., Giaever G., Eisen M., y Feldman M. 2005. Functional genomic analysis of the rates of protein evolution. *PNAS* 102: 5483-5488.
- Wallace A. 1997. *The origin of the animal body plans: A Study in Evolutionary Developmental Biology.* Cambridge University Press. Pp. 24-38. Cambridge, U.K, New York, NY, USA.
- Wang H., Lee E.M., Sperber S.M., Lin S., Ekker M. y Long Q. 2007. Isolation and expression of zebrafish zinc-finger transcription factor gene *tsh1*. *Gene Expression Patterns* 7: 318-322.
- Waskiewicz A.J., Rikhof H.A., Hernandez R.E. y Moens C.B. 2001. Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* 128: 4139-4151.
- Webb A.E., Sanderford J., Frank D., Talbot W.S., Driever W. y Kimelman D. 2007. Laminin $\alpha 5$ is essential for the formation of the zebrafish fins. *Developmental Biology* 311: 369-382.
- Wehrli M., Dougan S.T., Caldwell K., O'Keefe L., Schwartz S., Vaizel-Ohayonk D., Schejterk E., Tomlinson A. y DiNardo S. 2000. arrow encodes an LDL-receptorrelated protein essential for Wingless signaling. *Nature* 407: 527-530.
- Welscher P., Fernandez-Teran M., Ros M.A. y Zeller R. 2002. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *GENES & DEVELOPMENT* 16: 421-426.
- Wilm T.P. y Solnica-Krezel L. 2005. Essential roles of a zebrafish *prdm1/blimp1* homolog in embryo patterning and organogenesis. *Development* 132, 393-404.
- Wright, S. 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. En: *International Proceedings of the Sixth International Congress on Genetics.* pp. 356-366. Jones, D.F., ed.
- Wu J. y Cohen S.M. 1999. Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by *Homothorax* and *Distal-less*. *Development* 126: 109-117.
- Yamaguchi K., Parish J., Akita K., y Francis-West P. 2006. Developmental Expression of the Chick *four-jointed* Homologue. *Developmental Dynamics* 235: 3085-3091.
- Yan Y., Willoughby J., Liu D., Crump J.G., Wilson C., Miller C.T., Singer A., Kimmel C., Westerfield M. y Postlethwait J.H. 2005. A pair of *Sox*: distinct and overlapping functions of zebrafish *sox9* orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development* 132: 1069-1083.

- Yelick P.C., Abduljabbar T.S. y Stashenko P. 1998. zALK-8, A Novel Type I Serine/Threonine Kinase Receptor, Is Expressed Throughout Early Zebrafish Development. *Developmentl Dynamics* 211: 352–361.
- Yelon D., Ticho B., Halpern M.E., Ruvinsky I., Ho R.K., Silver L.M. y Stainier D.Y. 2000. The bHLH transcription factor *hand2* plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development* 127: 2573–2582.
- Yokoi H., Nishimatsu A., Ozato K. y Yoda K. 2003. Cloning and embryonic expression of six *wnt* genes in the medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to expression of *wnt5a* in the pectoral fin buds. *Develop. Growth Differ.* 45: 51–61.
- Yonei-Tamura S., Abe G., Tanaka Y., Anno H., Noro M., Ide H., Aono H., Kuraishi R., Osumi N., Kuratani S. y Tamura K.. 2008. Competent stripes for diverse positions of limbs/fins in gnathostome embryos. *Evol. Dev.* 10: 737-745.
- Zhao Q., Dobbs-McAuliffa B. y Linney E. 2005. Expression of *cyp26b1* during zebrafish early development. *Gene Expression Patterns* 5: 363-369.

Bases de Datos

Nombre de la Base de datos	Dirección URL
Ensembl Genome Browser	www.ensembl.org/index.html/
Expert Protein Analysis System (ExPASy)	www.expasy.ch/
Flybase	www.flybase.org/
Heliconius Homepage	http://heliconius.zoo.cam.ac.uk/heliconius/
Functional Protein Association Networks (STRING)	http://string.embl.de/
Information hyperlinked over Proteins (iHOP)	www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	www.genome.jp/kegg/
Mouse Genome Informatics (MGI)	www.informatics.jax.org/
NCBI Genome	www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome/
Nematostella.org	www.nematostella.org/
StellaBase	www.stellabase.org/
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/
WikiPathways	http://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways
WormBase	www.wormbase.org/
Zebrafish Information Network (ZFIN)	www.zfin.org/

Apéndices

Los Apéndices se encuentran en el archivo “apéndices.doc”. Poseen una numeración propia y todas sus citas se encuentran referenciadas en la sección de Bibliografía. A continuación se presentará el índice del contenido de dicho archivo.

APÉNDICE I: Desarrollo de la pata de <i>Drosophila</i>	1
1.- Establecimiento eje Dorso/Ventral	1
2.- Establecimiento del eje Anterior/Posterior	4
3.- Polarización Próximo/Distal	8
4.- Diferenciación de los segmentos	9
APÉNDICE II: Desarrollo de la aleta de pez cebra	17
1.- Acido retinóico y la vía de Shh	17
2.- Vía de Wnt	21
3.- Proteínas Fgf	22
4.- Vía de Bmp	24
5.- Importancia de los Heparan sulfato proteoglicanos (HSPG)	25
6.- Factores de transcripción	26
7.- Otras proteínas implicadas en el desarrollo de las aletas pectorales	28
APÉNDICE III: Genes candidatos a buscar cuyos experimentos no fueron realizados	30
1.- <i>aristaless (al)</i>	30
2.- <i>dishevelled (dsh)</i>	31
3.- <i>buttonhead (btd)</i>	31
4.- <i>shaggy (sgg)</i>	32
5.- <i>armadillo (arm)</i>	33
6.- <i>four-jointed (fj)</i>	33
7.- <i>dispatched (disp)</i>	34
8.- <i>grain (grn)</i>	34
APÉNDICE IV: Factores que influyen la tasa de evolutiva	35

