Quinto Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo

21-23 de septiembre de 2006
Alicante

Organizador:
José Luis Micol Molina

Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández de Elche

Comité organizador

Prof. Dr. José Luis Micol Molina, Presidente
Prof.ª Dra. María Rosa Ponce Molet
Prof. Dr. Víctor Quesada Pérez
Prof. Dr. Pedro Robles Ramos

Comité científico

Prof. Dr. José Pío Beltrán Porter, Presidente
Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez
Prof. Dr. Jordi García Fernández
Prof. Dr. Ariel Ruiz i Altaba
Prof. Dr. Salvador Martínez Pérez
Prof. Dr. Alberto Ferrús Gamero
Dr. Acaimo González Reyes
Prof. Dr. Juan Jiménez Martínez

Entidades colaboradoras

Ayuntamiento de Alicante
Bancaja
Instituto de Bioingeniería
International Journal of Developmental Biology
Generalitat Valenciana
Ministerio de Educación y Ciencia
Sociedad Española de Biología del Desarrollo
Universidad Miguel Hernández de Elche

Quinto Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo
21-23 de septiembre de 2006

El contenido de este libro no podrá ser reproducido, ni total ni parcialmente, sin el previo permiso del emisor. Reservados todos los derechos

Editor: Universidad Miguel Hernández

Autores: José Luis Micol Molina

ISBN: 84-96297-53-5
Depósito Legal: A-840-2006

Impreso en España / Printed in Spain
Fotocomposición, Impresión y Encuadernación:
CEE Limencop, S.L.
http://www.limencop.com
correo: publicaciones@limencop.com
correo: reprografia.elche@umh.es
Telf.: 966658487 / 966658791 / 965903400 Extension 2784

Este libro ha sido confeccionado por personal discapacitado perteneciente al Centro Especial de Empleo Limencop.

Limencop

Índice general

Programa 1

Índice de conferencias y comunicaciones 5

Conferencias y comunicaciones orales 15

Pósters 87

Índice de autores 153

Programa

MIÉRCOLES 20 DE SEPTIEMBRE

18:00-… Entrega de documentación

JUEVES 21 DE SEPTIEMBRE

8:00-… Entrega de documentación

8:45 Bienvenida: José Luis Micol (Universidad Miguel Hernández de Elche)

9:00 **Sesión 1: Desarrollo vegetal** 17
Moderador: Miguel A. Blázquez (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C.-Universidad Politécnica de Valencia)
Conferenciantes invitados: Paloma Más (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, C.S.I.C.) y Francisco Madueño (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C.-Universidad Politécnica de Valencia)

10:00 Comunicaciones orales

11:00 Pausa para tomar café

11:30 **Sesión 2: Evolución y desarrollo** 25
Moderador: Jordi García (Universidad de Barcelona)
Conferenciantes invitados: Ramón Muñoz-Chápuli (Universidad de Málaga) y Ulrich Technau (Universitetet i Bergen)

12:30 Comunicaciones orales

13:30 Comida de trabajo en el Hotel Meliá Alicante

14:30 Pósters

16:00 **Sesión 3: Células troncales** 33
Moderador: Ariel Ruiz i Altaba (Université de Genève)
Conferenciantes invitados: Isabel Fariñas (Universidad de Valencia) y Pedro Herrera (Université de Genève)

17:00 Comunicaciones orales

17:45 Pausa para tomar café

18:30 **Mesa redonda: Impacto social de la investigación con células madre**
Moderador: José Pío Beltrán (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, C.S.I.C.-Universidad Politécnica de Valencia)
Ponentes: Anna Veiga (Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona), Ariel Ruiz i Altaba (Université de Genève) y José María Perea (Diario Información, Alicante)

20:30 Desplazamiento de los congresistas, en autobús, desde el Hotel Meliá Alicante al Castillo de Santa Bárbara

21:00 **Cóctel de bienvenida**, ofrecido por el Ayuntamiento de Alicante en el Castillo de Santa Bárbara

VIERNES 22 DE SEPTIEMBRE

9:00 **Sesión 4: Organogénesis** 41
Moderador: Salvador Martínez (Instituto de Neurociencias, C.S.I.C.- Universidad Miguel Hernández de Elche)
Conferenciantes invitados: Luis Puelles (Universidad de Murcia) y Juan Antonio Montero (Universidad de Cantabria)

10:00 Comunicaciones orales

11:00 Pausa para tomar café

11:30 **Sesión 5: Desarrollo del sistema nervioso** 49
Moderador: Alberto Ferrús (Instituto Cajal, C.S.I.C.)
Conferenciantes invitados: Paola Bovolenta (Instituto Cajal, C.S.I.C.) y Patricia Boya (Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C.)
12:30 Comunicaciones orales
13:30 Comida de trabajo en el Hotel Meliá Alicante
14:30 Pósters
15:15 **Simposio sobre el *IJDB*** 57
Juan Aréchaga y David J. Fogarty, *International Journal of Developmental Biology*
16:00 **Sesión 6: Señalización** 61
Moderador: Acaimo González Reyes (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, C.S.I.C.-Universidad Pablo de Olavide)
Conferenciantes invitados: Isabel Guerrero (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C.) y Enrique Amaya (The Healing Foundation Centre)
17:00 Comunicaciones orales
18:00 Pausa para tomar café
18:30 **Homenaje a Eric H. Davidson** 71
Presentación: Antonio García-Bellido (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C.-Universidad Autónoma de Madrid)
Conferencia: Eric H. Davidson (California Institute of Technology)
Entrega de placa conmemorativa

SÁBADO 23 DE SEPTIEMBRE

9:00 **Sesión 7: Otros aspectos del desarrollo** 75
Moderador: Juan Jiménez (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, C.S.I.C.-Universidad Pablo de Olavide)
Conferenciantes invitados: David Gems (University College London) y José Pérez (Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C.)
10:00 Comunicaciones orales
11:00 Pausa para tomar café
11:30 **Homenaje a Antonio García-Bellido** 83
Presentación: Eric H. Davidson (California Institute of Technology)
Conferencia: Antonio García-Bellido (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C.-Universidad Autónoma de Madrid)
Entrega de placa conmemorativa
13:00 Asamblea de la SEBD
13:45 Recogida de pósters
14:00 Comida de clausura en el Restaurante Nou Manolín

Índice de conferencias y comunicaciones

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES ORALES

DESARROLLO VEGETAL

Ritmos circadianos en la acetilación de histonas: relevancia en el funcionamiento del reloj biológico de *Arabidopsis thaliana*
Más, P., y Perales, M. 19

Control genético de la arquitectura de la inflorescencia
Madueño, F., Ferrándiz, C., Beltrán, J.P., Serrano, A., Fernández-Nohales, P., Domenech, M.J., y Berbel, A. 20

Regulación transcripcional por auxinas de los genes del metabolismo de las giberelinas en Arabidopsis
Frigerio, M., Alabadí, D., Pérez-Gómez, J., García-Cárcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., y Blázquez, M.A. 21

CAPRICE and TRIPTYCHON increase the cell division rate in stoma-forming cell files in the hypocotyl
Serna, L. 22

Efectos pleiotrópicos de las mutaciones *ron1* de *Arabidopsis thaliana*
Robles, P., Alonso-Peral, M.M., Fleury, D., Cnops, G., Anami, S., Falcone, A., Ponce, M.R., Van Lijsebettens, M., y Micol, J.L. 23

Identificación mediante análisis transcriptómico de genes de *Arabidopsis thaliana* regulados por microARN
Aguilera, V., Robles, P., Jover-Gil, S., Barrero, J.M., Solano, R., Micol, J.L., y Ponce, M.R. 24

EVOLUCIÓN Y DESARROLLO

El origen del endotelio vascular
Muñoz-Chápuli, R., Carmona, R., Guadix, J.A., Macías, D., Portillo, V., y Pérez-Pomares, J.M. 27

Insights from an outgroup: Cnidaria and the evolution of bilaterian body plans
Technau, U. 28

Análisis comparativo de los genes *cabut* en invertebrados y vertebrados
Muñoz-Descalzo, S., Belacortu, Y., y Paricio, N. 29

Evolución de los linajes tempranos del blastocisto de ratón
Crespo, M., Pernaute, B., Cañón, S., Herranz, C., y Manzanares, M. 30

Los genes Tbx y el origen de las extremidades de los vertebrados
Minguillon, C., Del Buono, J., Gibson-Brown, J., y Logan, M. 31

El anfioxo, un pálido "filete de anchoa" para iluminar el origen de los vertebrados
Garcia-Fernández, J., Benito-Gutiérrez, E., D'Aniello, S., Jiménez-Delgado, S., Pascual-Anaya, J., Maeso, I., Irimia, M., y Bertrand, E. 32

CÉLULAS TRONCALES

Modulación de las células madre neurales por señales propias de los nichos neurogénicos
Andreu-Agulló, C., Ferrón, S.R., Sánchez-Gómez, P., Mira, H., y Fariñas, I. 35

Transgenic model of modulated inducible insulin cell ablation
Népote, V., and Herrera, P.L. 36

Sobreexpresión de Pitx2c en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias
Martínez-Fernández, S., Navarro, F., Hernández-Torres, F., Lozano, E., Franco, D., Lyons, G.E., y Aránega, A.E. 37

Migración y diferenciación de células madre en corazones de embriones de pollo
Torre Perez, N., Montero, J.A., Blanco, J., Rubio, N., y Hurle, J.M. 38

Control of brain stem cell and cancer stem cell behavior by Hedgehog-GLI signaling
Stecca, B., Clément, V., Sánchez, P., Mas, C., Zbinden, M., and Ruiz i Altaba, A. 39

ORGANOGÉNESIS

Segmentación neural en el embrión y el adulto: una noción sin alternativa aparente
Puelles, L. 43

Morfogénesis de los vientres musculares de la extremidad en desarrollo
Montero, J.A., Rodriguez-Guzman, M., y Hurle, J.M. 44

El factor de transcripción Snail1 en esqueletogénesis en mamíferos
Álvarez, C., Manzanares, M., Flores, J.M., y Nieto, M.A. 45

The Sp/Krüppel-like factor *Epiprofin/Sp6* is involved in AER compaction during limb development
Talamillo, A., Nakamura, T., de-Vega, S., Unda, F., Yamada, Y., and Ros, M.A. 46

Función de los genes *iroquois* (*Irx*) en el desarrollo del riñón de *Xenopus*
Alarcón, P., Fernández, A., y Gómez-Skármeta, J.L. 47

Formation and growth dynamics of mouse extra-embryonic tissues
Perea Gomez, A., Meilhac, S., Piotrowska-Nitsche, K., Collignon, J., and Zernicka-Goetz, M. 48

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

La formación de la fisura óptica depende de la actividad de BMP7 y SHH
Bovolenta, P., Morcillo, J., Martínez-Morales, J.R., Trousse, F., Fermin, Y., y Sowden, J.C. 51

Autofagia en el desarrollo embrionario
Boya, P. 52

How is the proneural otic domain established?
Abelló, G., Giráldez, F., and Alsina, B. 53

Dispersión celular y derivados nucleares de la eminencia talámica. Estudio en quimeras pollo/codorniz.
Alonso, A., Delgado, A., Delgado, F., Damas, C., Puelles, L., y Trujillo, C.M. 54

¿Existe relación entre patrón neurogenético y viabilidad celular en el mutante *weaver*?
Martí-Clúa, J., Santa-Cruz, M.C., y Hervás, J.P. 55

Estudio de la relación entre las roturas de doble cadena del DNA y la neurogénesis de la retina
Baleriola, J., y de la Rosa, E.J. 56

SIMPOSIO SOBRE EL *IJDB*

La revista española *The International Journal of Developmental Biology*, tendencias actuales de las publicaciones científicas internacionales y consejos útiles para los nuevos autores
Aréchaga, J., y Fogarty, D. 59

SEÑALIZACIÓN

Formación del gradiente morfogenético de Hedgehog
Callejo, A., Sierra, J., Gorfinkiel, N., Torroja, C., Bilioni, A., Quijada, L., Ibañez, C., y Guerrero, I. 63

Growth factor signal interpretation during early vertebrate development
Sivak, J., Petersen, L., Dorey, K., and Amaya, E. 64

Dorso-Ventral boundary formation in the *Drosophila* wing requires Cut-induced refractoriness to Wingless
Herranz, H., Canela, O., Sagués, F., Reigada, R., Buceta, J., and Milán, M. 65

Differential requirements for FGF3, FGF8 and FGF10 for inner ear development
Zelarayan, L.C., Vendrell, V., Alvarez, Y., Domínguez-Frutos, E., Alonso, M.T., Maconochie. M., and Schimmang, T. 66

FGFs downregulate BMP2 during cardiogenesis in developing chick
Lopez-Sanchez, C., Lopez-Gracia, M.L., Garcia-Masa, N., Ros, M., and Garcia-Martinez, V. 67

Interaction between polarity and JAK/STAT signalling
Sotillos, S., and Castelli-Gair, J. 69

HOMENAJE A ERIC H. DAVIDSON

The genomic control of development: A predictive gene regulatory network for the sea urchin embryo
Davidson, E.H. 73

OTROS ASPECTOS DEL DESARROLLO

Why we die: New insights into the biology of ageing from *C. elegans*
McElwee, J.J., Schuster, E., Piper, M., Blanc, E., Thornton, J.M., Partridge, L., and Gems, D. 77

Cdk2, a second essential cyclin-dependent kinase in the corn smut fungus *Ustilago maydis*
Castillo-Lluva, S., Flor-Parra, I., Steinberg, G., and Pérez-Martín, J. 78

Morfogénesis celular: ¿Por dónde crecer y por dónde dividirse?
Daga, R.R. 79

El papel de la proteín quinasa C en longevidad y en otros aspectos del desarrollo de *Caenorhabditis elegans*
Monje, J.M., Fidalgo, M.A., y Muñoz, M.J. 80

Cambios apoptóticos y expresión de "Caspasa-3-like" en la muerte celular del tapetum durante el desarrollo del polen
Chakrabarti, N., Cortés-Eslava, J., Rodríguez-Huete, A., Testillano, P.S., y Risueño, M.C. 81

"Key Experiments in Practical Developmental Biology. Marí-Beffa, M., and Knight, J. (eds.) (2005) Cambridge University Press. Cambridge: A teaching experience"
Marí-Beffa, M. 82

HOMENAJE A ANTONIO GARCÍA-BELLIDO

Control of size and shape in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*
García-Bellido, A. 85

PÓSTERS

DESARROLLO VEGETAL

Alteración del patrón radial del tallo de *Arabidopsis* por un alelo semidominante del gen *INCURVATA4*
González-Reig, S., Ochando, I., Ripoll, J.J., Vera, A., y Martínez-Laborda, A. 91

Genes con motivos KH de unión a RNA y regulación de la morfogénesis y la floración en *Arabidopsis*
Ripoll, J.J., Pérez-Amador, M.A., Alonso-Cantabrana, H., González-Reig, S., Carbonell, J., Martínez-Laborda, A., y Vera, A. 92

A leucine-rich repeat protein kinase regulates stomatal pattern in Arabidopsis
Cañamero, R.C., and Serna, L. 93

Iniciación y distribución de primordios de raíz lateral en raíces primarias de plantas silvestres y plantas transgénicas *agcr1* de *A. thaliana*
Casimiro, I., Calvo, V., y Casero, P.J. 94

Interacción entre las giberelinas y la luz para el establecimiento de la fotomorfogénesis
Gallego-Bartolomé, J., Alabadí, D., García-Cárcel, L., Orlando, L., Rubio, V., Espinosa, A., Deng, X.W., y Blázquez, M.A. 95

Generación de una colección de mutantes de *Medicago truncatula*: caracterización fenotípica del desarrollo de inflorescencias, flores y frutos.
Rochina, M.C., Benlloch, R., Caballero, T., Madueño, F., Cañas, L.A., y Beltrán, J.P. 96

TCU1* codifica una nucleoporina necesaria para el desarrollo foliar en *Arabidopsis thaliana
Alonso-Peral, M.M., Ferrández-Ayela, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 97

El gen *ICU2* participa en la herencia epigenética en *Arabidopsis thaliana*
González-Bayón, R., Barrero, J.M., del Pozo, J.C., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 98

Análisis genético y molecular del gen *DEN30* de *Arabidopsis thaliana*
Mollá-Morales, A., Robles, P., Guillo, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 99

Clonación posicional de mutaciones no señalizadas en *Arabidopsis thaliana*
Lozano, F.M., Mollá-Morales, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 100

Las mutaciones *hve* evidencian la relación entre la ubiquitinación y el desarrollo vascular en *Arabidopsis thaliana*
Alonso-Peral, M.M., Candela, H., del Pozo, J.C., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 101

SCA3* es esencial para la biogénesis de los cloroplastos y el desarrollo del mesófilo en *Arabidopsis thaliana
Quesada, V., Hricová, A., y Micol, J.L. 102

El gen nuclear *RUG2* de *Arabidopsis thaliana* codifica un presunto factor de terminación de la transcripción mitocondrial implicado en la organogénesis foliar
Quesada, V., Hricová, A., Pérez-Marcos, R., Graciá-Martínez, E., y Micol, J.L. 103

Clonación posicional de los genes *VEN4* y *VEN5* de *Arabidopsis thaliana*
González-Bayón, R., Lozano, F.M., Campello, L., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 104

La epidermis y el mesófilo contribuyen desigualmente a la forma final de las hojas de *Arabidopsis thaliana*
González-Bayón, R., Quesada, V., Robles, P., Campello, L., Ponce, M.R., y Micol, J.L. 105

Caracterización de dobles mutantes de *Arabidopsis thaliana* en los que se modifica el fenotipo Argonaute1
Aguilera, V., Micol, J.L., y Ponce, M.R. 106

CÉLULAS TRONCALES

Análisis del papel tejido específico del factor de transcripción Pitx2 durante el desarrollo cardíaco
Chinchilla, A., Hernández-Torres, F., Aránega, A., y Franco, D. 109

ORGANOGÉNESIS

Regulación de la expresión de dos nuevos mRNAs quimera generados a partir de los genes de *TIROSINA HIDROXILASA* y de *INSULINA*
Bártulos Encinas, O., Hernández Sánchez, C., Valenciano González, A., Mansilla Aparicio, A., y De Pablo Dávila, F. 113

Fasciculina II controla la función de EGFR durante proliferación celular en discos imaginales de *Drosophila*
Velásquez, E.M., y García-Alonso, L. 114

Patrón de expresión de Sonic hedgehog en la placa alar del prosencéfalo secundario del pollo
Ferrán, J.L., Bardet, S.M., Sánchez- Arrones, L., Medina, L., y Puelles, L. 115

Control of cell invagination by coordinated control of GAP and GEF Rho GTPase regulators
Castelli-Gair Hombría, J., Simoes, S., Jacinto, A., Denholm, B., and Sotillos, S. 116

Arterias y venas coronarias tienen un diferente origen embrionario
Portillo, V., Guadix, J.A., Clemente, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., y Pérez-Pomares, J.M. 117

Nuevos potenciales de diferenciación de los progenitores celulares del epicardio y del sistema vascular coronario
Ruíz-Moreno, A., González-Rosa, J.M., Guadix, J.A., Portillo, V., Muñoz-Chápuli, R., y Pérez-Pomares, J.M. 118

Cuantificación de ARNm y expresión proteica de las subunidades β de canales de potasio Kcne1-Kcne5 durante la cardiogénesis
De Castro, M.P., Aránega, A., y Franco, D. 119

Análisis de los genes realizadores del gen Hox *Abd-B*
Rivas Peña, M.L., y Castelli-Gair Hombría, J. 120

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Expresión de la subunidad β1 de integrinas en microglía ameboide cultivada in vitro sobre lámina basal de retina embrionaria
Tassi, M., Calvente, R., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A., Carrasco, M.C., Santos, A.M., y Navascués, J. 123

Expresión de *Dach2* durante el desarrollo del telencéfalo de pollo
Sandoval-Tortosa, J.E., Ferrán, J.L., y Puelles, L. 124

El hipotálamo de pollo y sus subdivisiones dorsoventrales y rostrocaudales durante el desarrollo
Bardet, S.M., y Puelles, L. 125

Delección de Sonic hedgehog por la endonucleasa Cre bajo el promotor de Engrailed1
Pérez-Balaguer, A., Puelles, E., y Martínez, S. 126

Especificación de oligodendrocitos en el encéfalo de aves
García-López, R., y Martínez, S. 127

Expresión del gen *FGF19* en el desarrollo del sistema nervioso central del pollo
Gimeno, L., y Martínez, S. 128

FGF8 controla el desarrollo normal del diencéfalo de mamíferos
Martínez, A., y Martínez, S. 129

Análisis de la falta de función de los genes Iroquois (*Irx*) durante el desarrollo del sistema nervioso en Xenopus
Rodríguez-Seguel, E., Alarcón, P., Fernández, A., y Gómez-Skármeta, J.L. 130

Mapa prospectivo del prosencéfalo en estadio de placa neural de pollo
Sánchez-Arrones, L., Ferrán, J.L., Rodríguez-Gallardo, L., y Puelles, L. 131

Estudio experimental de los territorios presuntivos y la migración tangencial palio-subpalial de neuronas en el telencéfalo del embrión de pollo
Pombero, A., y Martínez, S. 132

Microarchitectural changes during development of the cerebellar cortex
Mecha, M., Peña-Melián, A., Rabadán, M.A., Torres, J., Valero, M., and Blanco, M.J. 133

Estudio de las conexiones habenulares durante el desarrollo de la lamprea de mar
Rodríguez-Alonso, M., y Pombal, M.A. 134

Areas de proliferación y desarrollo postnatal en el telencéfalo de lagarto
Darias Perez, E., Damas Hernández, C., Delgado Fumero, A., Alonso Fuentes, A., y Trujillo Trujillo, C.M. 135

SEÑALIZACIÓN

Regulación del receptor de ecdisona tipo A mediante ubiquitinación por la E3 Ariadne durante la metamorfosis de *Drosophila*
Gradilla Castellanos, A.C., y Ferrús, A. 139

The PDZ protein Canoe/AF-6 links Ras-MAPK, Wingless/Wnt and Notch signaling pathways by binding Ras, Notch and Dishevelled
Speicher, S., Baylies, M., and Carmena, A. 140

La familia de genes Wnt no canónica y los genes homeobox T-box, están involucrados en la diferenciación del tracto digestivo en el pez cebra
Rojo Salvador, C., y González Martínez, E. 141

Hedgehog restricts its own expression domain in the Drosophila wing
Bejarano, F., Pérez, L., and Milán, M. 142

Cell cycle control during the transition from multipotency to differentiation in the Drosophila eye
Lopes, C.S., and Casares, F. 143

OTROS ASPECTOS DEL DESARROLLO

Regulación de las células madre de un melanoma humano en cultivos *in vitro* de embriones post-implantados de ratón
Azcoitia, I., Andollo, N., Eguizábal, C., Andrade, R., Arlucea, J., Boyano, M.D., y Aréchaga, J. 147

Función de *hibris* en el establecimiento de la polaridad celular plana epitelial en *D. melanogaster*
Belacortu, Y., Muñoz-Descalzo, S., Durupt, F.C., Artero, R.D., y Paricio, N. 148

Regulación del desarrollo dependiente de *FLO11* en levaduras
Barrales, R.R., Jiménez, J., e Ibeas, J.I. 149

Efectos de la radiofrecuencia (RF) sobre el tejido conjuntivo en el crecimiento de la cola de ratas Sprague-Dawley
Beltrán, E., Zuasti, A., Ferrer, C., Navarro, S., Bernal-Mañas, C.M., Canteras, M., y Pastor, L.M. 150

Papel de TGF-β1 y TGF-β3 en la muerte celular de la costura epitelial medial durante la fusión del paladar
Murillo, J., Del Río, A., Barrio, M.C., Garcillán, B., Amorós, M., Fuerte, T., Fernández, A., Martínez-Sanz, E., Maldonado, E., González, I., y Martínez-Álvarez, C.....151

Conferencias y comunicaciones orales

DESARROLLO VEGETAL

Ritmos circadianos en la acetilación de histonas: relevancia en el funcionamiento del reloj biológico de *Arabidopsis thaliana*

Más, P., y Perales, M.

Consorcio CSIC-IRTA, Laboratorio de Genética Molecular Vegetal (IBMB-CSIC), C/ Jordi Girona, 18-26, Barcelona 08034.

Numerosos procesos biológicos en la naturaleza oscilan rítmicamente con una periodicidad de 24 horas. Estos ritmos, denominados circadianos, están controlados por un oscilador endógeno o reloj biológico que es capaz de coordinar fisiología y metabolismo en resonancia con el ciclo ambiental externo. Conceptualmente, el reloj biológico se ha dividido en tres principales componentes: ruta de entrada, oscilador central y ruta de salida. La ruta de entrada está representada por aquellos componentes del reloj capaces de percibir y transmitir la información medioambiental para sincronizar el oscilador central. Este oscilador es el marcapasos responsable de generar el ritmo circadiano en los numerosos procesos biológicos que constituyen los componentes de la ruta de salida. En nuestros estudios, hemos determinado los mecanismos celulares y moleculares responsables de la regulación de *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESIÓN 1*), un componente esencial en el funcionamiento del reloj en *Arabidopsis thaliana*. Utilizando la técnica de la inmuno-precipitación de cromatina, demostramos que la expresión de *TOC1* se correlaciona con los cambios rítmicos en la acetilación de la histona H3 así como de co-activadores transcripcionales capaces de remodelar la estructura de la cromatina. La represión circadiana de la expresión de *TOC1* depende de la acción coordinada entre actividades de desacetilación de histonas y la acción represora de componentes del reloj. La compleja interacción entre activadores y represores modula la expresión de *TOC1* en diferentes foto-periodos y define un mecanismo importante en la regulación de procesos fisiológicos y de desarrollo controlados por el reloj.

Control genético de la arquitectura de la inflorescencia

Madueño, F., Ferrándiz, C., Beltrán, J.P., Serrano, A., Fernández-Nohales, P., Domenech, M.J., y Berbel, A.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), CSIC - Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, Valencia 46022, Spain.

La gran diversidad de arquitecturas de las plantas depende de la actividad del meristemo apical del tallo (SAM), que genera todos los órganos de la parte aérea de la planta. El meristemo del tallo es inicialmente vegetativo, produciendo hojas y ramas, y posteriormente se transforma en inflorescente y produce flores. La arquitectura depende de la proporción de los distintos tipos de órganos que se producen, hojas, ramas, flores, y del momento y la posición en que se forman. Especies como Arabidopsis, Antirrhinum, o guisante, tienen inflorescencias indeterminadas, en las que el SAM crece de manera continuada. Otras especies, como tabaco o tomate, poseen inflorescencias determinadas, donde el SAM se diferencia, formando una flor terminal. *TFL1* es un regulador clave de la arquitectura de la inflorescencia, siendo responsable del carácter indeterminado. Así, las mutaciones *tfl1* convierten la inflorescencia de Arabidopsis en determinada. En nuestro grupo estudiamos la regulación de *TFL1*. El promotor de *TFL1* es complejo y la mayoría de sus elementos reguladores residen en el 3'. Modificaciones en la expresión de *TFL1* conllevan cambios dramáticos en la arquitectura de Arabidopsis, lo que sugiere que puede haber tenido un papel clave en la evolución de la arquitectura de la inflorescencia. Por otra parte, mientras que Arabidopsis o Antirrhinum tienen una inflorescencia simple, donde el SAM produce directamente las flores, leguminosas como guisante o Medicago tienen una inflorescencia compleja, donde el SAM no produce las flores sino que produce unos meristemos secundarios (I2) donde se forman las flores. Hemos aislado el gen *VEG1*, de guisante, responsable de la identidad de los meristemos I2. Los mutantes *veg1* muestran un fenotípo único de no floración, donde las inflorescencias secundarias son reemplazadas por tallos vegetativos.

Regulación transcripcional por auxinas de los genes del metabolismo de las giberelinas en Arabidopsis

Frigerio, M.[1], Alabadí, D.[1], Pérez-Gómez, J.[2], García-Cárcel, L.[1], Phillips, A.L.[2], Hedden, P.[2], y Blázquez, M.A.[1]

[1]Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Valencia.
[2]Rothamsted Research, Harpenden, Reino Unido.

Las auxinas y las giberelinas (GA) participan en la regulación de varios programas del desarrollo de las plantas, como el crecimiento de la raíz, la expansión y la diferenciación celular. Esta observación nos plantea el interrogante de si estas hormonas interactúan regulando dianas en común y que tipo de interacción ocurre. En nuestro laboratorio hemos encontrado que las auxinas regulan la expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis y la inactivación del las GA. Esta regulación presenta características cinéticas diferentes en cada uno de los genes diana, pero se puede concluir que la regulación es rápida, se bloquea mediante tratamientos con inhibidores del proteasoma, y se mimetiza con el inhibidor de la síntesis de proteínas, lo que sugiere una implicación directa de los genes Aux/IAA-ARF en la regulación del metabolismo de GA. Que esta regulación tiene relevancia fisiológica se apoya en las siguientes observaciones: (1) un mutante superprouctor de auxinas (*yucca*) presenta el mismo tipo de regulación que con los tratamientos exógenos con auxinas; (2) mutantes de ganancia de función de Aux/IAA presentan una menor capacidad de síntesis de GA. Además, parte del fenotipo de insensibilidad a auxinas en estos mutantes puede rescatarse con aplicaciones de GA; y (3) las auxinas no alteran el patrón espacial de expresión de los genes del metabolismo de GA, sino sólo su nivel. Nuestros datos permiten concluir que parte del papel de las auxinas en la regulación del desarrollo vegetal se ejerce indirectamente a través de la regulación del metabolismo de GA.

CAPRICE and TRIPTYCHON increase the cell division rate in stoma-forming cell files in the hypocotyl

Serna, L.

Facultad de Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, E-45071 Toledo, Spain.

In the hypocotyl, epidermal cells are arranged in columns running parallel to the long axis of the seedling. Cells in epidermal files overlying two cortical cell files, which may enter into the stomatal pathway, are shorter than those in files overlying a single cortical cell file. These differences in cell length are telling us that the epidermal cells in files overlying two cortical cell files exhibit a division rate higher that those in epidermal files overlying a single cortical cell file. Although plants homozygous for mutations in either *CAPRICE* (*CPC*) or *TRIPTYCHON* (*TRY*) single–repeat MYB genes do not exhibit an apparent phenotype, the *cpc try* double mutant displays a reduced cell division rate in the files overlying two cortical cell files. Recent studies have shown that *CPC* is expressed in files overlying a single cortical cell file. Here I show that the protein locates also in the files overlying two cortical cell files. Taken together, I propose that CPC (and perhaps TRY) moves from non-stomata-forming cell files to the nucleus of neighbouring stoma-forming cell files, where increase the cell division rate in a redundant manner with *TRY*.

Efectos pleiotrópicos de las mutaciones *ron1* de *Arabidopsis thaliana*

Robles, P.[1], Alonso-Peral, M.M.[1], Fleury, D.[2], Cnops, G.[2], Anami, S.[2], Falcone, A.[2], Ponce, M.R.[1], Van Lijsebettens, M.[2], y Micol, J.L.[1]

[1]División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.
[2]Department of Plant Systems Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Ghent University, Technologiepark 927, B-9052 Ghent, Bélgica.

Las mutaciones recesivas *rotunda* (*ron*) ensanchan y redondean las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana*. El mutante *ron1* manifiesta además alteraciones en la transición floral y el desarrollo radicular y el reproductivo. Hemos clonado posicionalmente el gen *RON1*, que ha resultado ser *FIERY1* (*FRY1*; también conocido como *SAL1*), que codifica una enzima bifuncional con actividad inositol polifosfato 1-fosfatasa, que interviene en el catabolismo del IP_3 y reprime la señalización del ácido abscísico. Aunque se ha demostrado la implicación de FRY en la señalización por fosfoinosítidos, es poco lo que se sabe acerca de su papel en el desarrollo. Mediante un análisis de micromatrices hemos comprobado que la mutación *ron1* afecta, entre otros, a genes implicados en procesos relacionados con la síntesis de los flavonoides y el inositol, la señalización y el transporte de las auxinas, y los ritmos circadianos. Hemos confirmado mediante PCR cuantitativa la desregulación de varios de estos genes, lo que podría explicar algunos de los rasgos fenotípicos de *ron1*, como la perturbación de la diferenciación de las venas foliares o la mayor longitud de los pelos radiculares.

Identificación mediante análisis transcriptómico de genes de *Arabidopsis thaliana* regulados por microARN

Aguilera, V., Robles, P., Jover-Gil, S., Barrero, J.M., Solano, R.[1], Micol, J.L., y Ponce, M.R.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.
[1]Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid.

Pretendemos identificar genes directa o indirectamente regulados por la maquinaria de regulación génica postranscripcional mediada por microARN en *Arabidopsis thaliana*. Con este fin, hemos llevado a cabo un análisis comparativo de la expresión génica, mediante micromatrices, de estirpes portadoras de mutaciones en los genes *AGO1*, *HEN1*, *HYL1*, *HST* y *DCL1*, que codifican componentes de la ruta de los microARN. Hemos identificado varios cientos de genes significativamente sobreexpresados en estos mutantes, entre los que se encuentran dianas demostradas de los microARN, así como otras que habían sido predichas pero no confirmadas mediante ensayos funcionales. Estamos caracterizando además el fenotipo de los mutantes *ago1-52, hen1-13*, *hyl1-12*, *hst-21* y *dcl1-9*, a nivel morfológico, histológico, fisiológico y de interacciones genéticas. Nuestros resultados demuestran que estas mutaciones interaccionan sinérgicamente, y sugieren que la ruta de los microARN está implicada en la especificación de la proximodistalidad y la formación del patrón de venación de las hojas vegetativas.

EVOLUCIÓN Y DESARROLLO

El origen del endotelio vascular

Muñoz-Chápuli, R., Carmona, R., Guadix, J.A., Macías, D., Portillo, V., y Pérez-Pomares, J.M.

Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

Existen grandes diferencias entre el sistema cardiovascular de vertebrados y los sistemas circulatorios de los diferentes *phyla* de invertebrados. Los sistemas hemales de invertebrados forman una red de espacios limitados por las láminas basales del endodermo, del epitelio celómico o de células mioepiteliales de origen celómico. No existe, en ningún caso, un auténtico endotelio vascular. En cambio, los vertebrados poseen vasos revestidos de células endoteliales en contacto con células musculares lisas o pericitos. No existe una teoría filogenética sobre el origen del endotelio en vertebrados. Tampoco se conoce con precisión el origen ontogenético de las células endoteliales. Diferentes modelos proponen un origen embrionario a partir de hemangioblastos (precursores de endotelio y células sanguíneas), progenitores vasculares bipotenciales (precursores de endotelio y células musculares lisas), o incluso sugieren la existencia de un endotelio primario hemogénico que origina progenitores hematopoyéticos. Nosotros proponemos un modelo, basado en datos comparativos y embriológicos, que sugiere un origen filogenético del endotelio a partir de hemocitos de invertebrados con capacidad de adhesión a las láminas basales del sistema hemal. La transición se produciría mediante la adquisición de uniones intercelulares, capacidad propia de producción de lámina basal y de comunicación molecular con las células perivasculares. La capacidad de revertir al fenotipo mesenquimático e invasivo que caracteriza al endotelio angiogénico permite la invasión y vascularización de los territorios somáticos que son especialmente importantes en vertebrados. Dado el probable origen celómico de los hemocitos de invertebrados, todos los elementos del sistema circulatorio de vertebrados tendrían en última instancia un origen relacionado con el celoma, lo cual puede conducir a una síntesis de los distintos modelos sobre el origen ontogenético del endotelio.

Insights from an outgroup: Cnidaria and the evolution of bilaterian body plans

Technau, U.

Sars Centre for Marine Molecular Biology, Bergen, Norway.

According to recent molecular phylogenies the Cnidaria are the sister group to the Bilateria. As such, they take a strategic position in the understanding of key features of bilaterian body plans. Textbook knowledge states that Cnidaria are diploblastic and radially symmetric with a single, oral-aboral axis. For comparison, Bilateria are triploblastic and have two body axes, the dorso-ventral and the anterior-posterior body axis. In an attempt to understand the evolution of these key bilaterian features, we searched in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* for genes involved in the formation of these bilaterian characters. It appears that *Nematostella* has most of the "mesodermal" genes and many of them are expressed during and after gastrulation at the blastopore or in the endoderm. In order to determine the level of homology, we investigated three genes in more detail and show that conserved functions are found on the cellular and subcellular level. Genes typically involved in dorso-ventral axis formation in Bilateria are asymmetrically expressed along the directive axis, i.e. perpendicular to the oral-aboral axis and might contribute to the patterning of the directive (and to some extent to the oral-aboral) axis in the endoderm. We also investigated the possible existence of a Hox gene cluster in *Nematostella*. I show that while some anterior Hox genes remain linked in the genome, the cluster has been split, reshuffled and undergone independent gene duplications. The most parsimonious scenario suggests the independent Hox cluster evolution in Cnidaria and Bilateria form a minimal ProtoHox cluster. Since most of the genes show identical but asymmetric expression patterns with respect to the oral-aboral axis in *Nematostella*.

Análisis comparativo de los genes *cabut* en invertebrados y vertebrados

Muñoz-Descalzo, S., Belacortu, Y., y Paricio, N.

Departamento de Genética, Facultad CC Biológicas, Universidad de Valencia, E-46100 Burjassot.

cabut (*cbt*) es un gen de *D. melanogaster* implicado en la elongación y el ensamblaje del cable contráctil de las células más dorsales de la epidermis lateral durante el proceso de cierre dorsal embrionario. Durante este proceso actúa por debajo de la ruta JNK, regulando la expresión de *dpp*. Este gen codifica un hipotético factor de transcripción que contiene tres dedos de zinc tipo C_2H_2 y una región rica en serina. Mediante búsquedas exhaustivas en bases de datos de secuencias genómicas de varios organismos, hemos encontrado que *cbt* tiene ortólogos en todas las especies de *Drosophila* analizadas (*D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis* y *D. grimshawi*), en otros insectos (*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Bombix mori*, *Apis mellifera* y *Tribolium castaneum*), y también en vertebrados (*Pan troglotydes*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis* y *Homo sapiens*). En invertebrados, la mayoría de ortólogos de *cbt* son genes no descritos previamente. En el caso de vertebrados, los genes *cbt* son conocidos como *TIEG* (*Transforming Growth factor beta-Inducible Early Genes*), implicados en crecimiento celular y cáncer. Nuestros resultados muestran que la estructura exón-intrón de los genes *cbt* se encuentra conservada en la mayoría de invertebrados, aunque no en vertebrados. Respecto a las proteínas Cabut, todas ellas contienen los tres dedos de zinc pero no la región rica en serina, que en algunos casos ha sido eliminada o sustituida por otros motivos. Además, encontramos que la expresión de *cbt* en la epidermis lateral embrionaria está conservada en algunas de las especies de *Drosophila* analizadas, lo que indica que los genes *cbt* de esas especies podrían tener un papel durante el cierre dorsal embrionario, como ocurre en *D. melanogaster*.

Evolución de los linajes tempranos del blastocisto de ratón

Crespo, M., Pernaute, B., Cañón, S., Herranz, C., y Manzanares, M.

IIB Alberto Sols CSIC-UAM Madrid.

En nuestro laboratorio estudiamos las redes genéticas que controlan las primeras decisiones de linaje en el embrión de ratón para conocer hasta qué grado están conservadas evolutivamente. En el blastocisto de ratón aparecen tres tipos celulares: el epiblasto (EPI), el trofoectodermo (TE) y el endodermo primitivo (PE). Su identidad depende de la expresión localizada de un número restringido de genes: Oct4 y Nanog promueven la formación del EPI, mientras que Oct4 inhibe la formación del TE y Nanog la del PE. Cdx2 promueve la formación del TE e inhibe la formación del EPI, mientras que GATA-6 promueve la formación del PE y bloquea la del EPI. En fases posteriores, Eomes contribuye a la formación del ectodermo extraembrionario y el mesodermo embrionario. Hemos encontrado genes homólogos de Cdx2, Eomes y Nanog en el pollo, no así de Oct4. Cdx2 y Eomes se expresan en el área opaca, que dará lugar al ectodermo extraembrionario del embrión de pollo. Sin embargo, Nanog aparece principalmente en las células primordiales germinales. Mediante el uso de ratones transgénicos estamos estudiando los mecanismos que regulan la expresión de estos genes. Por el momento se han hallado elementos de Cdx2 y Eomes de ratón y de pollo que dirigen expresión en el blastocisto de ratón. La caracterización de las relaciones regulatorias entre estos genes nos permitirá comprender las primeras decisiones de linaje en el embrión del ratón.

Los genes Tbx y el origen de las extremidades de los vertebrados

Minguillon, C., Del Buono, J., Gibson-Brown, J., y Logan, M.

Division of Developmental Biology, National Institute for Medical Research, London.

Está ampliamente aceptado que dos rondas de duplicación del genoma tuvieron lugar durante la evolución de los vertebrados. Así pues, cambios en este "nuevo" material genético, tanto a nivel de la secuencia codificante como a nivel de secuencias reguladoras, podrían haber sido instrumentales para la adquisición de innovaciones morfológicas que caracterizan a los vertebrados.
Los factores de transcripción *Tbx4* y *Tbx5* tienen una función esencial durante los procesos más tempranos de inducción del crecimiento de las extremidades de los vertebrados. Es interesante destacar que el cordado invertebrado anfioxo, que no posee extremidades pares, posee un único gen *Tbx4/5*. Nosotros estamos investigando si la duplicación del único gen *Tbx4/5* estuvo involucrada en el origen de las extremidades durante la evolución de los vertebrados. Para ello, estamos analizando si el único gen *Tbx4/5* del anfioxo es capaz de rescatar el fenotipo de falta de extremidades delanteras que tiene el ratón knock-out condicional de *Tbx5*. También estamos analizando las regiones reguladoras que se encuentran en la región genómica del gen *Tbx4/5* del anfioxo mediante técnicas de recombinación homóloga en bacterias y experimentos de transgénesis en embriones de ratón.

El anfioxo, un pálido “filete de anchoa” para iluminar el origen de los vertebrados

Garcia-Fernández, J., Benito-Gutiérrez, E., D’Aniello, S., Jiménez-Delgado, S., Pascual-Anaya, J., Maeso, I., Irimia, M., y Bertrand, E.

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona.

Las teorías de finales del siglo XX sobre la base genética de la transición invertebrados/vertebrados sugieren que fenómenos de duplicación génica a gran escala, llegando a la doble poliploidización, pudieron haber facilitado la invención de características morfológicas complejas. El material genético virgen y redundante tras la duplicación podría haber sido pues substrato para la neofuncionalización de genes y redes génicas clave para el desarrollo embrionario, que a su vez habrian sido la base del incremento en complejidad. No obstante, las más actuales ponen de manfiesto que además (¿sobre todo?) son los cambios en las regiones reguladoras, y la cooptación génica, las máximos responsables del cambio e invención. El término “complejidad” no es de fácil definición. No obstante, algunas estructuras o sistemas vertebrados sin duda son más “complejos” que sus homólogos en invertebrados. Como ejemplos, aspectos tales como la segmentación del romboencéfalo, el número de neuronas, la diversidad de tipos neuronales, o la capacidad de establecer múltiples conexiones sinápticas simultáneas pero moduladas diferencialmente, sí podrían considerarse características comparativamente complejas. En nuestro laboratorio investigamos el cefalocordado anfioxo, justo en la fontera invertebrados/vertebrados. Nuestros datos más recientes sugieren que no sólo de la duplicación y cooptación de genes y redes génicas se nutrieron los primeros vertebrados, sino que en algún caso, además, se crearon, probablemente por barajado de exones, nuevos genes, y nuevas redes génicas, capaces de realizar acciones no vistas aún en la evolución animal. Asimismo, el genoma de anfioxo está completado y en las fases finales de ensamblado y anotación. Y además, por primera vez, hemos consguido la reproducción “a la carta”, en el laboratorio, de éste nuestro pequeño modelo, y estamos iniciando los abordajes para conseguir nuestro pequeño “sueño”, modificar genéticamente el embrión de anfioxo para testar, experimentalmente, los cambios que la genómica y embriogenética comparada sugieren pueden haber sido el motor del origen de uno de los grupos de animales más complejo, hasta llegar a nosotros mismos.

CÉLULAS TRONCALES

Modulación de las células madre neurales por señales propias de los nichos neurogénicos

Andreu-Agulló, C., Ferrón, S.R., Sánchez-Gómez, P., Mira, H., y Fariñas, I.

Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot.

La enorme plasticidad de las células madre, unida a su capacidad de expansión *ex vivo,* ofrece la posibilidad de obtener poblaciones celulares puras con un fenotipo celular elegido y en número suficiente para la terapia celular dirigida en el contexto, por ejemplo, de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la expansión de las células madre, esto es, la proliferación *in vitro* de estas células inducida por factores mitogénicos, necesaria para la obtención de un número suficiente de células, se produce, en la mayoría de los casos, a expensas de su multipotencialidad. Aunque el mayor potencial diferenciador parece radicar en las células madre embrionarias, la existencia de células madre en diversos tejidos, como son las células madre neurales obtenidas del cerebro adulto, ofrece la posibilidad de obtener información relativa a señales propias del nicho o microambiente que estas células ocupan. Muchas de las señales que regulan el comportamiento de las células madre en los nichos son todavía desconocidas, pero está claro que sus acciones determinan la persistencia de un conjunto controlado de células madre durante toda la vida del individuo y la producción de progenie en condiciones de homeostasis así como modulan/inducen la respuesta regenerativa en condiciones de depleción celular. Por tanto, los conocimientos derivados del estudio de las células madre somáticas podría conducir, en una situación ideal, a la reactivación de las células madre endógenas, eliminando la necesidad del transplante. Recientemente hemos identificado la participación del PEDF (*Pigment Epithelium Derived Factor*), producido por células ependimarias y endoteliales, en la regulación de las NSCs de la zona subventricular en el cerebro adulto de roedores.

Transgenic model of modulated inducible insulin cell ablation

Népote, V., and Herrera, P.L.

University of Geneva, Faculty of Medicine, Switzerland.

We have generated a transgenic mouse model of inducible diabetes in which specific destruction of pancreatic insulin-producing β-cells is obtained upon administration of an inducer drug with no side effects: diphtheria toxin (DT). Transgenic mice carry a transgene encoding the human DT receptor (HB-EGF) under the control of rat insulin II promoter. All, or half, β-cells in these mice bear the DT receptor on their surface, and administration of DT triggers their complete or partial ablation, respectively. Mice become overtly diabetic as soon as three days after one single DT injection. Glycemia remains consistently elevated for several weeks, with progressive polyuria, glycosuria, hyperphagia, polydipsia, cachexia and, finally, death. These animals will be used in clonogenic cell reconstitution assays to determine the differentiation potential of injected progenitor or surrogate β-cells. Very importantly, these mice allow us to accurately assess islet regeneration and its mechanisms after total or partial destruction of the β-cell mass.

Sobreexpresión de Pitx2c en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias

Martínez-Fernández, S., Navarro, F., Hernández-Torres, F., Lozano, E., Franco, D., Lyons, G.E.*, y Aránega, A.E.

Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén. España.
*Department of Anatomy, University of Wisconsin Medical School, USA.

Aunque datos previos indican que Pitx2c es la principal isoforma del factor de transcripción Pitx2 implicada en el desarrollo cardiaco, se desconocen cuales son los mecanismos moleculares por los que este factor de transcripción ejerce su función durante la cardiogénesis. Para investigar el papel de Pitx2c en los procesos de diferenciación cardiaca, la línea de células madre embrionarias R1 fue transfectada con la construcción αMHC-Pitx2c-IRES-puromicina para seleccionar cardiomiocitos-derivados que sobreexpresen la isoforma *Pitx2c*. Análisis mediante RT-PCR a tiempo real mostró sobreexpresión de Pitx2c en áreas contráctiles de 7+7 y 7+13 días de diferenciación *in vitro*. Análisis de expresión génica reveló un descenso en los niveles de expresión para los genes del ciclo celular ciclina D1, ciclina D2 y c-myc en áreas contráctiles que sobreexpresan *Pitx2c* a los 7+13 días de diferenciación *in vitro*. Sin embargo, las áreas contráctiles sobreexpresando Pitx2c de 7+7 y 7+13 días de diferenciación mostraron un incremento de los niveles de expresión de los factores reguladores de la cardiogénesis GATA4, GATA6, Tbx2, Tbx5, Irx4; estos incrementos fueron mayores para los factores que regulan los mecanismos transcripcionales de formación de cámaras cardiacas *in vivo* (Tbx2, Tbx5 y ANF). Estos resultados sugieren que Pitx2c podría estar implicado en la regulación del programa transcripcional de formación de cardiomiocitos de cámaras cardiacas.

Migración y diferenciación de células madre en corazones de embriones de pollo

Torre Perez, N., Montero, J.A., Blanco, J., Rubio, N., y Hurle, J.M.

Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Uno de los aspectos claves de la terapia celular son los mecanismos que regulan la migración y asentamiento de las células madre en los tejidos lesionados. En este proyecto presentamos evidencias que indican que el miocardio lesionado (por microquemadura) sufre una regulación positiva en la expresión MCP-1 y WNT5a y que la administración ectópica de estos factores tiene un efecto de atracción sobre las células madre procedentes de cordón umbilical humano e implantadas en la superficie de corazones embrionarios de pollo.

Control of brain stem cell and cancer stem cell behavior by Hedgehog-GLI signaling

Stecca, B., Clément, V., Sánchez, P.*, Mas, C., Zbinden, M., and Ruiz i Altaba, A.

University of Geneva Medical School, Dept. of Genetic Medicine and Development, CMU 8242, 1 rue Michel Servet, CH1211 Geneva, Switzerland.
*Departament de Biologia Cel.lular, Universitat de València, 46100 Burjassot, València, Spain.

Signaling by Hedgehog ligands regulate the GLI code. We and others* have shown that Hedgehog-GLI signaling is implicated in modulating precursor proliferation in the brain, including in the cerebellum (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999), tectum and cortex (Dahmane *et al*., 2001). HH signaling is also required for the behavior of brain stem cell lineages (Palma and Ruiz i Altaba, 2004; Palma *et al*., 2005). In addition, altered HH signaling can induce tumor formation (Dahmane *et al*., 1997; 2001) and is critical for the sustained growth of a variety of mouse and human tumors (Dahmane *et al*., 2001; Sanchez *et al*., 2004; Sanchez and Ruiz i Altaba, 2005). How HH signaling interacts with other pathways involved in stem cell behavior and cancer remains unclear. We will present recent work on the roles of the HH-GLI pathway in cancer stem cells.

*Only our refs are listed due to space constraints.

Dahmane, N., *et al*. (1997). Activation of Gli1 and the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Skin Tumors. *Nature* **389**: 876-881.

Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**:3089-3100.

Dahmane, N., *et al*. (2001) The SHH-Gli pathway in brain growth and tumorigenesis. *Development* **128**: 5201-5212.

Palma, V., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Hedgehog-Gli signaling controls the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**: 337-345.

Sanchez P, *et al*. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 12561-12566.

Sanchez, P., Ruiz i Altaba, A. (2005). In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice. *Mechanisms of Development*. **122**: 223-230.

Palma, V., *et al*. (2005). Shh-Gli signaling controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**: 335-344.

ORGANOGÉNESIS

Segmentación neural en el embrión y el adulto: una noción sin alternativa aparente

Puelles, L.

Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

Se examinará el aun escasamente comprendido fenómeno de regionalización anteroposterior del tubo neural de los vertebrados, también conocido como segmentación neural. Al hilo de este recorrido, en el que aparece como protagonista oculto el eje longitudinal del esbozo neural, se irán mostrando datos que sustentan un número evolutivamente constante de límites transversales, reconocibles desde su instauración por especificación molecular en estadios muy tempranos hasta su repercusión estructural en el cerebro adulto. Si bien se discute aun semánticamente la definición del concepto de segmento neural o neurómero, no parece haber hasta la fecha alternativas que puedan competir con la potente visión global del desarrollo neural que la concepción segmentaria ofrece.

Morfogénesis de los vientres musculares de la extremidad en desarrollo

Montero, J.A., Rodriguez-Guzman, M., y Hurle, J.M.

Departamento de Anatomía y Biología Celular. Universidad de Cantabria. Santander 39011. Spain.

La morfogénesis del sistema muscular en vertebrados es un aspecto del desarrollo embrionario que permanece bastante inexplorado tanto a nivel celular como molecular. En nuestra comunicación presentamos evidencias morfológicas y funcionales que indican que la muerte celular apoptótica juega un papel relevante como mecanismo morfogenético en la formación de los vientres musculares individuales en la extremidad de vertebrados, similar al descrito durante el desarrollo del sistema nervioso. Las fibras musculares se producen en exceso en las masas musculares dorsal y ventral del esbozo de la extremidad, y aquellas que no consiguen establecer una unión apropiada con los tendones digitales, acaban degenerando por un mecanismo de muerte celular programada. La caracterización molecular de este proceso apoptótico apunta un papel relevante para la señalización por ácido retinoico así como la mediación de caspasa 3 y enzimas lisosomales tipo catepsinas en la regresión de las células musculares esqueléticas.

El factor de transcripción Snail1 en esqueletogénesis en mamíferos

Álvarez, C., Manzanares, M., Flores, J.M., y Nieto, M.A.

Instituto de Neurociencias de Alicante, CSIC-UMH, San Juan de Alicante, Alicante, España.

Trabajos anteriores del laboratorio han implicado a los genes Snail en la inducción de la transición epitelio-mesénquima (TEM), fundamental para la producción de distintos tejidos durante el desarrollo embrionario. Esta transición confiere a las células propiedades migratorias e invasivas. Los mutantes deficientes en Snail no sobreviven las etapas de gastrulación por su incapacidad de sufrir TEMs. Por el contrario, su actividad debe estar reprimida en el adulto para mantener la homeostasis tisular. De hecho, la activación aberrante de Snail en carcinomas se ha relacionado con su capacidad invasiva y de recurrencia. Por lo tanto, es interesante averiguar el impacto de la falta de silenciamiento de Snail en distintas poblaciones celulares en las que debe estar reprimido. Hemos generado ratones transgénicos con la posibilidad de activar Snail por la administración de tamoxifeno. Durante el desarrollo de la extremidad, Snail se expresa de forma muy controlada espacial y temporalmente en una población de condrocitos en vías de diferenciación. Nuestros datos indican que su activación aberrante y sostenida va acompañada de una reducción de la placa de crecimiento, dando lugar a un fenotipo de huesos cortos con características semejantes a las observadas en acondroplasias en humanos. Tanto los pacientes como los modelos murinos de acondroplasia se han relacionado con mutaciones constitutivas del receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR3). Nuestros datos indican que en el sistema cartílago-hueso Snail está implicado no solamente en la diferenciación condrocítica por medio de la regulación de la expresión de distintos colágenos sino también en el control de la proliferación celular mediando la señalización de los FGFs.

The Sp/Krüppel-like factor *Epiprofin/Sp6* is involved in AER compaction during limb development

Talamillo, A.[1, 4], Nakamura, T.[2], de-Vega, S.[2], Unda, F.[3], Yamada, Y.[2], and Ros, M.A.[1]

[1]Departamento de Anatomía y Biología Celular. Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain.
[2]Craniofacial Developmental Biology and Regeneration Branch, NIDCR, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892.
[3]Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, 48490 Leioa, Spain.
[4]Unidad de Genómica Funcional, CIC Biogune. Parque Tecnológico de Bizkaia. Edificio 801A, 48160 Derio, Spain.

The formation and maintenance of the apical ectodermal ridge (AER) is critical for the outgrowth and patterning of the vertebrate limb. We have investigated the biological role of *Epiprofin* (*Epfn/Sp6*), a member of the Sp/KLF transcription factor family expressed in the AER, during limb development. *Epfn-/-* mutant mice have a defective pattern in the autopod with mesoaxial syndactyly in the forelimb and synostosis (bony fusion), in the hindlimb. *Epfn-/-* mutants also show a defect in the maturation of the AER. We also show that *Epfn* expression in the limb ectoderm is dependent on Wnt/β-catenin signaling but not on Fgf signaling. In addition, we show that Epfn is sufficient to activate *Fgf8* expression in the limb ectoderm. Our data allows a model in which Epfn mediates Wnt/β-catenin-dependent induction of Fgf8 in the process of AER induction and maintenance.

Función de los genes *iroquois* (*Irx*) en el desarrollo del riñón de *Xenopus*

Alarcón, P., Fernández, A., y Gómez-Skármeta, J.L.

Centro Andaluz de Biología del desarrollo (CABD), CSIC/Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

El riñón embrionario de *Xenopus* (pronefros) es un excelente modelo para el estudio del desarrollo del riñón adulto de mamíferos (metanefros) por su simplicidad estructural y porque las mismas vías señalizadoras parecen participar en la formación de ambos tipos renales. Los genes homeobox *iroquois* (*Irx*), se requieren para la especificación y subdivisión de diversos órganos de vertebrados e invertebrados (sistema nervioso, corazón, ojo, ala). En vertebrados, *Irx* están agrupados en dos complejos génicos, *IrxA* e *IrxB*, con tres genes cada uno (*Irx1*, *2* y *4* e *Irx3*, *5* y *6*; respectivamente). Nuestro grupo ha observado que, en *Xenopus*, *Irx1-4*, pero no *Irx5* y *6*, se expresan en neurula tardía en el mesodermo que dará lugar a los pronefros. Esta expresión se mantiene hasta que estos órganos son funcionales. Para analizar el papel de los genes *Irx* en la nefrogénesis hemos sobreexpresado o depletado en embriones de *Xenopus* los distintos genes *Irx*, solos o en combinaciones de ellos. En estas condiciones, hemos examinado distintos marcadores moleculares (renales, mesodermicos, neurales). Nuestros resultados indican que los genes *Irx* de *Xenopus* son necesarios para la nefrogénesis, en particular las proteínas parálogas Irx1 y 3. Los parálogos Irx2 y 4 son, posiblemente, redundantes.

Formation and growth dynamics of mouse extra-embryonic tissues

Perea Gomez, A.[1,2], Meilhac, S.[1], Piotrowska-Nitsche, K.[1], Collignon, J.[2], and Zernicka-Goetz, M.[1]

[1]The Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute. University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QN United Kingdom.
[2]Institut Jacques Monod CNRS UMR 7592, Univeristés Paris 6, Paris 7. 2, place Jussieu 75005 Paris, France.

The establishment of anterior-posterior polarity in the mouse requires reciprocal interactions between the pluripotent epiblast and two extra-embryonic tissues, the extra-embryonic ectoderm and the visceral endoderm. Central to this process is the specification of the anterior visceral endoderm (AVE), a signalling centre essential for the formation and maintenance of anterior neural tissue. Despite recent advances in our understanding of the molecular interactions underlying the differentiation of the visceral endoderm, little is known about the cellular bases of the regionalization of this tissue and its timing. Based on morphological observations, we show that the extra-embryonic region is visible shortly after implantation at the late E4.5 stage. We propose a new mechanism for the formation of this region involving an active folding of the extra-embryonic ectoderm. To trace visceral endoderm cells, we microinjected mRNAs encoding fluorescent proteins into single surface cells of the inner cell mass of the E3.5 blastocyst and analyzed the distribution of labelled cells at E4.5, E5.5 and E6.5. Our results indicate that even after the embryonic and extra-embryonic regions of the visceral endoderm acquire specific cellular and molecular characteristics, they do not correspond to distinct cellular compartments. This implies extrinsic control of the regionalization of the visceral endoderm. Finally a clonal analysis of the AVE demonstrates for the first time that this anterior signalling centre arises from more than a single precursor between E3.5 and E5.5.

DESARROLLO
DEL SISTEMA NERVIOSO

La formación de la fisura óptica depende de la actividad de BMP7 y SHH

Bovolenta, P.[1], Morcillo, J.[1], Martínez-Morales, J.R.[1], Trousse, F.[1], Fermin, Y.[1], y Sowden, J.C.[2]

[1]Departamento de Neurobiología del Desarrollo, Instituto Cajal, CSIC, Dr. Arce 37, Madrid 28002, Spain.
[2]Developmental Biology Unit, Institute of Child Health, 30 Guilford Street, University College London, London, WC1N 1EH

El disco óptico se desarrolla al borde entre la retina neural y el tallo óptico, permitiendo la salida de fibras visuales y la entrada de las células mesenquimaticas que darán lugar a la arteria hialoidea. A pesar de la importancia del disco óptico para la función ocular, poco se sabe de los mecanismos moleculares que controlan su formación. Presentaremos datos que demuestran que los precursores del disco óptico tienen una identidad específica y que su formación depende de la actividad secuencial de BMP7 y Shh, dos moléculas señalizadoras de las familias de las Bone Morfogenetic Proteins y hedgehog, respectivamente. Así, en embriones de ratones deficientes para *Bmp7*, el disco óptico no se forma. Su ausencia se asocia a una disminución de la proliferación y de la apoptosis en el cuadrante proximo-ventral de la copa óptica. Además, la arteria hialoidea no se desarrolla, el nervio óptico es aplasico y los axones de las células ganglionares de la retina se acumulan en el espacio sub-retiniano. BMP7 es capaz de rescatar la formación de los precursores del disco óptico en cultivos organotípicos de esbozos ópticos de embriones *Bmp7*$^{-/-}$ mientras que Follistatina, un antagonista de BMP7, previene su formación en etapas tempranas pero no tardías de la formación de la copa óptica en embriones salvajes. En cambio, en etapas tardías, interferencia con la vía de señalización de Shh previene la formación de los precursores del disco óptico, mientras que la presencia de SHH reestablece la formación de estas células en cultivos de copas ópticas de embriones de ratones *ocular retardation (or)*, donde el disco óptico no se mantiene como consecuencia de la ausencia de las células ganglionares, la fuente fisiológica de SHH.

Autofagia en el desarrollo embrionario

Boya, P.

Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid.

La autofagia es un proceso celular que se encarga de la degradación y reciclaje de proteínas de vida media larga. Durante la autofagia, porciones del citosol, incluyendo orgánulos completos, son englobadas en una doble membrana que se cierra para formar una vacuola de autofagia o autofagosoma, que se fusionará con un lisosoma digiriendo los componetes intracelulares. A nivel molecular, la autofagia está empezando a ser caracterizada gracias a la reciente descripción de las proteínas Atg, de las que existen homólogos desde levaduras hasta mamíferos. La formación de la precisa citoarquitectura del sistema nervioso, esencial para su compleja función, depende de un fino balance entre proliferación, diferenciación y muerte celular. La muerte celular tiene ya un importante papel durante la neurulación y la neurogénesis, etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso. En general esta muerte es de tipo apoptótico, aunque también se han observado fenómenos de muerte por autofagia durante el desarrollo. Estudios recientes indican que la autofagia podría jugar un papel durante el desarrollo embrionario. Mutantes de las proteínas Atg en *Arabidopsis, Dictiostelium, Drosophila* y *C. elegans* muestran alteraciones del desarrollo que incluso pueden llevar a la letalidad. Ratones nulos para la proteína Beclina (el ortólogo de Atg6), no llegan a desarrollarse, y la delección monoalélica provoca numerosos tumores. Por otro lado, aunque los ratones nulos para Atg5 se desarrollan con normalidad, mueren más rápido que sus hermanos silvestres en condiciones de ayuno de nutrientes. Es desconocida la función del resto de las proteínas Atg en el desarrollo de vertebrados.

How is the proneural otic domain established?

Abelló, G., Giráldez, F., and Alsina, B.

Biologia del Desenvolupament, DCEXS, UPF, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona.

Most of the sensory input of the vertebrate head is captured from the cranial sensory organs and ganglia that transmit external information to the CNS. Sensory systems share the same developmental origin, are derived from the placodes, ectodermal thickenings that can generate a vast array of specialized cell-types as sensory neurons, supporting cells and/or sensory receptor cells. Only a small region of the otic placode gives rise to neurons. This region that we have called *proneural domain* is characterized by the expression of proneural genes, FGF10 and Sox3. Complementary to the proneural domain, the so called *non-neural territory*, expresses Lmx1 and Iroquois1, Hairy1 and Serrate1. Our work shows that anterior-posterior regionalization is a progressive event that is initiated in the ectoderm before otic placode is morphologically visible and requires the activation of the Notch signalling pathway. At otic cup stage, proneural and non-neural territories present restricted cell intermingling, as revealed by double DiI and DiO injection experiments. DiI/DiO labelled clones exhibited an antero-postero boundary that was coincident with the *FGF0*/*Hairy1* expression limits. We blocked Notch signalling by the γ-secretase inhibitor (DAPT) and found that Notch had different functions in the proneural and non-neural domains. Notch regulates cell specification of neuronal cells in the proneural domain by lateral inhibition, but moreover Notch signalling is required for regionalizing the patterning genes *Lmx1* and *Irx1* to the posterior compartment. Thus, we propose that two well-defined territories develop at early stages of otic development and Notch signalling pathway is required in both of them. Moreover, we are currently investigating the role of Hairy1 repressor in the non-neural domain.

Dispersión celular y derivados nucleares de la eminencia talámica. Estudio en quimeras pollo/codorniz.

Alonso, A.[1], Delgado, A.[1], Delgado, F.[2], Damas, C.[2], Puelles, L.[3], y Trujillo, C.M.[1]

[1]Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna.
[2]Dpto. Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento. Facultad de Psicología. Universidad de La Laguna.
[3]Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

La eminencia talámica (Emt) es una estructura embrionaria del cerebro de vertebrados amniotas, mientras que en anamniotas permanece en el adulto. Se sabe poco acerca de su papel durante el desarrollo y de sus derivados en el cerebro adulto. Estudios morfológicos, autorradiográficos y de expresión génica han puesto en evidencia una posible migración hacia zonas telencefálicas (Trujillo, 1982; Altman y Bayer, 1989; Puelles et al., 2000). Nuestro propósito ha sido demostrar experimentalmente la existencia de estas migraciones utilizando cerebros quimeras pollo/codorniz en los que se ha trasplantado de forma homotópica e isocrónica el territorio presuntivo de la (Emt). Hemos visto que células originadas en la Emt migran hacia territorios subpaliales: el área entopeduncular anterior, la amígdala extendida y la zona del subpallium en la que se sitúan las comisuras pallial, septal y anterior. También hemos constatado que la Emt aporta numerosas células a los núcleos pretalámicos rostrales. La hibridación *in situ* para el gen Tbr1, que en el diencéfalo sólo se expresa en la Emt, nos ha permitido descartar a otros territorios diencefálicos como origen de estás células migratorias. Mediante técnicas inmunohistoquímicas con diversos marcadores hemos determinado que la mayoría de estas células son neuronas. Una parte de ellas expresan Tbr1 y son glutamatérgicas, pero existe otra subpoblación cuyo fenotipo queda aún por determinar.

¿Existe relación entre patrón neurogenético y viabilidad celular en el mutante *weaver*?

Martí-Clúa, J., Santa-Cruz, M.C., y Hervás, J.P.

Unidad de Citología e Histología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

El mutante *weaver* es un modelo animal útil para abordar el estudio de aquellas entidades neurológicas que cursan con disfunciones del cerebelo o con déficits en dopamina. Mediante varias técnicas, que incluyen autorradiografía e immunocitoquímica, se han realizado diversos experimentos encaminados a determinar si la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales del cerebelo (neuronas de Purkinje y de los núcleos profundos) y del mesencéfalo (neuronas dopaminérgicas de la substancia negra y del área ventral tegmental) de los ratones *weaver* puede relacionarse con características del patrón neurogenético de éstas. La aproximación experimental consistió en inyectar timidita tritiada a hembras gestantes y sacrificar a los descendientes (ratones control y homozigóticos *weaver*) a los 90 días de edad. La frecuencia de neuronas generadas en cada intervalo embrionario se estima tras la correspondiente técnica autorradiográfica, en tanto que las neuronas dopaminérgicas fueron inmunodetectadas para la tiroxina hidroxilasa. La valoración estadística mostró que el perfil neurogenético fue similar entre el grupo control y el mutante para cada una de las poblaciones estudiadas si bien, el patrón generacional de las neuronas dopaminérgicas presentó claras diferencias entre ambos genotipos para las poblaciones del cerebro medio investigadas. La cuantificación neuronal puso de manifiesto que todas las poblaciones estudiadas estaban numéricamente reducidas en el grupo mutante respecto del control. De estos datos se desprende que la supervivencia neuronal en el cerebelo no se relaciona con el programa neurogenético, en tanto que en el cerebro medio, las neuronas que sobreviven son mayoritariamente aquellas de generación temprana.

Estudio de la relación entre las roturas de doble cadena del DNA y la neurogénesis de la retina

Baleriola, J., y de la Rosa, E.J.

Centro de Investigaciones Biológicas, C/Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

El proceso de muerte celular de las neuronas de proyección durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), explicado según la Teoría Neurotrófica es un fenómeno fisiológico regulado, necesario para el correcto desarrollo del SNC. Pero en etapas anteriores a la diferenciación neuronal, donde sólo hay células proliferativas o neuroblastos recién diferenciados, existen otras oleadas de muerte celular programada. La apoptosis durante estas etapas tempranas de la neurogénesis puede tener diferentes finalidades: ajustar los números de precursores neurales, selección de fenotipos neurales y eliminación de células genéticamente anormales. Adicionalmente las lesiones en el DNA son un estímulo apoptótico significativo para las neuronas inmaduras en el SNC en desarrollo. Una de las lesiones que más compromete la viabilidad celular, si no es reparada adecuadamente, es la rotura bicatenaria. Existen evidencias de que la correcta reparación del DNA es crucial para la formación del SNC: la deleción de genes de enzimas de reparación es letal en el ratón de edades embrionarias por pérdida masiva de células neurales. Nuestro objetivo es determinar si existe relación entre la neurogénesis, los sistemas de reparación y la apoptosis mediada por roturas bicatenarias en el DNA. Utilizamos como modelo la neurorretina de ratón embrionario.

SIMPOSIO SOBRE EL *IJDB*

La revista española *The International Journal of Developmental Biology*, tendencias actuales de las publicaciones científicas internacionales y consejos útiles para los nuevos autores

Aréchaga, J., y Fogarty, D.

The International Journal of Developmental Biology, Universidad del País Vasco. http://www.ijdb.ehu.es

La producción esencial de la investigación experimental básica y aplicada son los artículos en revistas científicas profesionales; las conferencias, las patentes, los informes técnicos o las monografías son sólo frutos ocasionales de lo anterior. Con nuestra presentación pretendemos abordar en primer lugar los orígenes, la evolución y el estado actual de la revista *The International Journal of Developmental Biology,* su vinculación con la *Sociedad Española de Biología del Desarrollo* y los problemas que tiene actualmente la publicación de revistas científicas de calidad en España. Posteriormente, trataremos de los parámetros bibliométricos objetivos y del impacto de las nuevas tecnologías en la edición de revistas profesionales, para finalizar con unos consejos útiles sobre el *savoir faire* de una buena publicación científica, dirigido esencialmente a los postgraduados y, en general, a todos aquellos que se enfrentan a la necesidad de redactar sus primeros artículos internacionales.

Referencias útiles de los autores:

Aréchaga, J. (2002). Spanish scientific journals; the forgotten investment. *International Microbiology* **5**: 105-106.

Aréchaga, J. (2005). Las revistas profesionales como claves para el desarrollo de la Ciencia, la Medicina y la Tecnología en España*. Gaceta de la Real Sociedad de Matemática Española* **8**: 37-50.

Aréchaga, J., y Fogarty, D.J. (2002). Publicaciones científicas profesionales en España: situación actual y parámetros de calidad. *Mediatika* **8**: 233-245.

De León, M., y 23 firmas más. 4 de septiembre de 2003. *Manifiesto de El Escorial sobre el estado actual y el futuro de las publicaciones científicas.*

SEÑALIZACIÓN

Formación del gradiente morfogenético de Hedgehog

Callejo, A., Sierra, J., Gorfinkiel, N., Torroja, C., Bilioni, A., Quijada, L., Ibañez, C., y Guerrero, I.

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

La molécula señalizadora Hedgehog (Hh) y los componentes genéticos de su vía de señalización están conservados evolutivamente pero fueron inicialmente descritos en *Drosophila melanogaster*. Se considera que Hh es un morfógeno que induce, según su concentración, diferentes destinos celulares durante el desarrollo. Para explorar el mecanismo de formación del gradiente de Hh usamos como modelo el primordio del ala de *Drosophila*, donde Hh es sintetizado por un grupo de células (compartimento posterior), y migra desde éstas, a las células capaces de responder al morfógeno (compartimento anterior). El mecanismo de difusión de Hh es extremadamente complejo ya que la molécula activa de Hh está modificada por los lípidos, colesterol y acido palmítico, y estas modificaciones, en principio, impedirían su disociación de la membrana plasmática de las células secretoras. Sin embargo, hemos visto que estas modificaciones lipídicas se requieren para la correcta formación del gradiente de Hh, en los procesos de secreción, migración y recepción. Estos dos últimos procesos parecen estar controlados por la interacción de Hh con los Heparan-Sulfato-Protein-Glicanos (HSPG) de la matriz extracelular y con Patched (el receptor de Hh). En nuestra búsqueda de nuevos genes implicados en la señalización de Hh hemos encontrado que el producto del gen *shifted* es un factor secretable que media la interacción entre Hh y los HSPGs. Shifted es el ortólogo del supresor de tumores WIF (Wnt inhibitory factor). Hemos observado que este factor modula la estabilidad y la distribución extracelular de Hh en *Drosophila*. Sin embargo, la proteína WIF de humanos inhibe la señalización de Wnt en *Drosophila* y en vertebrados sin afectar a la de Hh. El dominio denominado caja WIF es el que da la especificidad de Shifted por Hh o por Wnt.

Growth factor signal interpretation during early vertebrate development

Sivak, J., Petersen, L., Dorey, K., and Amaya, E.

Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute, University of Cambridge, UK.
The Healing Foundation Centre, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK.

Vertebrate gastrulation requires coordination of mesoderm specification with morphogenetic movements. While both of these processes require FGF signaling, it is not known how mesoderm specification and cell movements are coordinated during gastrulation. The related Sprouty and Spred protein families are recently discovered regulators of receptor tyrosine kinase signaling. We have identified four genes for the Sprouty family and two genes for the Spred family in *Xenopus tropicalis*. In gain- and loss-of-function experiments we show that XtSprouty and XtSpred proteins modulate different signaling pathways downstream of the FGF receptor (FGFR), and consequently different developmental processes. Notably, XtSproutys inhibit morphogenesis and Ca^{2+} and PKCδ signaling, leaving MAPK activation and mesoderm specification intact. In contrast, XtSpreds inhibit MAPK activation and mesoderm specification, with little effect on Ca^{2+} or PKCδ signaling. These differences, combined with the timing of their developmental expression, suggest a mechanism to switch FGFR signal interpretation to coordinate mesoderm formation and cell movements during gastrulation.

Dorso-Ventral boundary formation in the *Drosophila* wing requires Cut-induced refractoriness to Wingless

Herranz, H.[1], Canela, O.[2], Sagués, F.[3], Reigada, R.[3], Buceta, J.[2], and Milán, M.[1]

[1]ICREA and Institut de Recerca Biomèdica (IRB), Parc Científic de Barcelona Josep Samitier, 1-5, 08028 Barcelona, Spain.
[2]Centre de Recerca en Química Teòrica (CeRQT), Parc Científic de Barcelona Josep Samitier, 1-5, 08028 Barcelona, Spain.
[3]Departament de Química Física, Universitat de Barcelona. Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona, Spain.

Gene regulatory networks in developing organisms have been conserved during evolution. The *Drosophila* wing primordium and the vertebrate hindbrain share a common gene network that establishes the boundary between dorsal and ventral compartments in the wing and adjacent rhombomeres in the hindbrain. By means of a Systems Biology approach that combines in silico and in vivo experiments, we propose a regulatory network for the establishment and maintenance of the dorsal-ventral (DV) boundary in the *Drosophila* wing. We show how short-range cell interactions, mediated by the receptor Notch and its ligands, together with long-range cell interactions, mediated by the Wingless signaling molecule, shape the boundary and establish the gene expression pattern that is observed in in vivo experiments. Moreover, we present evidence that a novel property is required for the understanding of the gene interactions that lead to the formation of a stable DV boundary: refractoriness to the Wingless signaling molecule mediated by *cut* activity.

Differential requirements for FGF3, FGF8 and FGF10 for inner ear development

Zelarayan, L.C., Vendrell, V., Alvarez, Y., Domínguez-Frutos, E., Alonso, M.T., Maconochie. M., and Schimmang, T.

Instituto de Biología y Genética Molecular. Universidad de Valladolid - CSIC.

FGF signalling is involved during multiple steps of inner ear development, including induction of the otic placode, formation and morphogenesis of the otic vesicle and cellular differentiation within the sensory epithelia. Here, we have addressed the role of FGF3, FGF8 and FGF10 during various of these steps in the murine and avian inner ear. In mouse embryos, hindbrain-derived FGF10 ectopically induces FGF8 and rescues otic vesicle formation in Fgf3 and Fgf10 homozygous double mutants. However, conditional inactivation of Fgf8 after or during induction of the murine inner ear placode did not interfere with formation, morphogenesis and differentiation of the inner ear. In contrast, inactivation of Fgf8 during induction of the inner ear placode on a homozygous null background for Fgf3 leads to a reduced size otic vesicle or the complete absence of otic tissue. In the chicken embryo, misexpression of Fgf3 in the hindbrain induces ectopic otic vesicles in vivo. On the other hand, Fgf3 expression in the hindbrain or pharyngeal endoderm is required for formation of the otic vesicle from the otic placode. These results provide insights how the spatial and temporal expression of various FGFs control different steps of inner ear formation during vertebrate development.

FGFs downregulate BMP2 during cardiogenesis in developing chick

Lopez-Sanchez, C.[1], Lopez-Gracia, M.L.[2], Garcia-Masa, N.[1], Ros, M.[2], and Garcia-Martinez, V.[1]

[1]Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Extremadura, P.O. Box 108, 06080 Badajoz, Spain.
[2]Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Cantabria, 31007 Santander, Spain.

During early chick gastrulation, groups of cells from the primitive streak, caudal to Hensen's node, invaginate to form the mesoderm, between epiblast and hypoblast, constituting the heart forming region (HFR), the mesodermal precardiogenic area (mesoderm HFR) located rostral, at both sides of the embryo, closely related with the anterior endoderm (endoderm HFR). At this time, precardiac mesoderm (mesoderm HFR) and surrounding endoderm (endoderm HFR) are characterized by expressing the earliest specific cardiac marker: cNkx-2.5. It has been previously suggested that Bmp2, which is expressed at the level of the endoderm HFR, is required for early expression of the transcription factor cNkx-2.5. This hypothesis is based in several experiments consisting in the administration of exogenous BMP2 at the level of the non precardiogenic area, located between HFR and midle line, inducing the expression of cNkx-2.5. Furthermore this experiment also shows the ability of BMP2 to induce the expression of Fgf8, Gata4 and Hex, which are genes related with cardiogenesis. In fact, experiments based in the exogenous administration of FGF8, located at the level of the non precardiogenic area, lateral to HFR, have shown the inductive ability to induce the expression of cNkx-2.5, but not BMP2. Moreover, we have shown that FGF4 is able to induce the expression of cNkx-2.5 in non precardiogenic area, at the level of germinal cell crescent (GCC). However, in some other non precardiogenic tissue, such as explanted caudal lateral mesoderm, a combination of BMP2 and FGF4, but neither factor alone, is able to induce cNkx-2.5 expression. All these experiments suggest that the initial cardiogenesis is regulated by a closely relation between Bmp2 and Fgfs. However, several aspects of the pathways signaling remain unclear, unknowing the exactly roles of regulative ability of Bmp2 over Fgfs, and viceversa, increased by a no precise and delimited area corresponding to HFR, as well as the expanded periods of cardiogenesis analyzed by several authors. Even, there is not a precise description of the areas corresponding to the expression of genes involved in cardiogenesis, and the temporo-spatial correlation between them during gastrulation and HFR development. In this work we analyze the effect of Fgf8 and Fgf4 on cardiac gene expression in order to evaluate how the signaling pathways are integrated to regulate the early cardiogenesis. For that, we gene transfer Fgf8 and Fgf4 into the primitive streak precardiogenic cells by electroporation of chick embryos in vitro; and ectopic administration of beads soaked in FGF8 or FGF4 protein placed into HFR. Our results reveal that overexpression of Fgfs in precardiogenic cells downregulates the expression of cNkx-2.5, probably by downregulation of Bmp2 expression. It could be hypothesized that during cardiogenesis in the developing chick, Bmp2 upregulates Fgfs, and high level of Fgfs downregulates Bmp2, establishing a

negative feedback mechanism to finish the cardiogenic process of differentiation, when morphogenetic process is initiating the formation of tubular cardiac structures.

Interaction between polarity and JAK/STAT signalling

Sotillos, S., and Castelli-Gair, J.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo/CSIC/UPO.

Epithelial cells are polarized along the apicobasal axis. This polarization is essential for the subcellular localization of adhesion and signalling proteins, so it allows to coordinate changes in cell morphology with morphogenetic movements and cell proliferation required for the development of an organism[1]. Cell polarity in vertebrate and *Drosophila* epithelia is established by the apical aPKC/Par-6/Par-3 and Crumbs/DPatj/Stardust and the basolateral Dlg/Lgl/Scrible complexes[2]. Synergistic and antagonistic interactions between these complexes allow the subdivision of the cellular membrane into different domains. However, it is becoming increasingly clear that, apart from maintenance of cell polarity, these complexes also function modulating the activity of signalling pathways (with the Wnt pathway: Lgl and Dsh[3]; and with the Notch pathway: Lgl and N[4,5]; Par-1 and N[6]). Spiracles are an ideal system for studying the control of cell shape and cell rearrangements[7]. Among others factors spiracle development is controled by the JAK/STAT pathway. We will present data showing the subcellular localisation of the JAK/STAT signalling components. We have observed that most of them are located in the apical part of the plasma membrane suggesting a spatial restriction in the cell and, thus, in signalling. This spatial localization depends on protein complexes located in the in the marginal zone of the epithelial cells.

1.- Drubin, D.G., and Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335–344.
2.- Wodarz, A. (2002). Establishing cell polarity in development. *Nat. Cell Biol.* **4**, E39-E44.
3.- Dollar, G.L., Weber, U., Mlodzik, M., and Sokol, S.Y. (2005). Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled. *Nature* **437**, 1376-1380.
4.- Langevin, J., *et al.* (2005). Lethal giant larvae controls the localization of notch-signaling regulators numb, neuralized, and Sanpodo in Drosophila sensory-organ precursor cells. *Curr. Biol.* **15**, 955-962.
5.- Roegiers, F., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2005). Regulation of membrane localization of Sanpodo by lethal giant larvae and neuralized in asymmetrically dividing cells of Drosophila sensory organs. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3480-3487.
6.- Herranz, H., Stamataki, E., Feiguin, F., and Milan, M. (2006). Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-Secretase activity. *EMBO Rep*. **7**, 297-302.
7.- Hu, N., and Castelli-Gair, J. (1999). Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev. Biol.* **214**, 197-210.

HOMENAJE A ERIC H. DAVIDSON

The genomic control of development: A predictive gene regulatory network for the sea urchin embryo

Davidson, E.H.

Division of Biology 156-29, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125, USA.

This talk will concern the gene regulatory network (GRN) for endomesoderm specification in sea urchin embryos. The network, which now contains ~50 genes, mainly regulatory genes, is a powerful tool for both explanation and prediction, extending from the phenomenology of development to *cis*-regulatory functions at the nodes of the GRN. The GRN is formulated on the basis of prior knowledge of the developmental process, detailed observations on spatial and temporal patterns of gene expression, and a large-scale perturbation analysis. The GRN is represented in computational models that permit predictions of *cis*-regulatory inputs at the nodes of the GRN, and that display the gene regulatory transactions that are active or inactive in given spatial domains of the embryo at given times. Among the computational methodologies developed to support the GRN analysis is a new application of interspecific sequence comparisons which has proven experimentally to be remarkably useful for rapid identification of *cis*-regulatory elements. Experimental verification of *cis*-regulatory predictions has been obtained in remarkable detail for many key nodes of the GRN, indicating that it provides a true representation of encoded genomic regulatory logic for early development.

OTROS ASPECTOS DEL DESARROLLO

Why we die: New insights into the biology of ageing from *C. elegans*

McElwee, J.J.[1], Schuster, E.[2], Piper, M.[1], Blanc, E.[2], Thornton, J.M.[2], Partridge, L.[1], and Gems, D.[1]

[1]Department of Biology, University College London, UK.
[2]European Bioinformatics Institute, Hinxton CB10 1SD, UK.

Understanding the ageing process is one of the most formidable challenges to modern biology. Over the last decade, major advances have been made thanks to the application of simple classical genetic techniques. This approach begins with isolating mutants with altered rates of ageing, and cloning the gene affected. Here, the nematode *Caenorhabditis elegans* is ideal, since it has well developed genetics, its genome is sequenced, and its lifespan is a mere 2-3 weeks. Studies of *C. elegans* mutants with 2-3 fold increases in adult lifespan led to the discovery that the nematode insulin/IGF-1 signalling (IIS) pathway is a powerful regulator of ageing. Remarkably, reduced IIS also increases lifespan in the fruitfly *Drosophila melanogaster*, and reduced IGF-1 or insulin signalling can increase lifespan in mice. Thus, the role of IIS in control of ageing is evolutionarily conserved, or *public*. But how does IIS exert such a powerful control on ageing? DNA microarray analysis has shown that IIS regulates a large number of downstream genes, some of which must directly control longevity and ageing. Identifying these genes and the processes they specify is the key to understanding the ageing process. Non-biased analysis of microarray data from long-lived IIS mutants, and long-lived *C. elegans* diapausal dauer larvae implicates certain processes in longevity assurance, particularly drug detoxification (which removes diverse toxic and damaged molecular moieties from the cell) and heat shock protein (which restore misfolded proteins to their working conformation). Of particular interest now is the question: are the genes and biochemical processes through which IIS acts also public, and if so, what are these processes? New studies suggest that the longevity assurance mechanisms via which IIS acts are lineage-specific at the gene level (private), but may be conserved at the process level (semi-public).

Cdk2, a second essential cyclin-dependent kinase in the corn smut fungus *Ustilago maydis*

Castillo-Lluva, S., Flor-Parra, I., Steinberg, G., and Pérez-Martín, J.

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Campus de Cantoblanco-UAM. 28049 Madrid. Spain.

Cdk2 is a member of the Pho85 family of cyclin-dependent kinases. Unlike other fungal members of this family, Cdk2 appears to be essential for growth in *U. maydis*. A temperature-sensitive allele of *cdk2* was generated, caused cell separation defects, G1 arrest and polarity defects at restrictive temperature. Therefore, the essential function may involve cell cycle control and morphogenesis. To further characterize the roles of Cdk2 in *U. maydis*, we also analyzed the putative cyclin partners. We found seven distinct cyclin genes (*pcl1-7*) and we started the search for suppressors of the growth defects present in the ts-mutant. Details of this search will be provided.

Morfogénesis celular: ¿Por dónde crecer y por dónde dividirse?

Daga, R.R.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo/Universidad Pablo de Olavide. Carretera de Utrera Km1. 41013, Sevilla.

La morfogénesis celular es fundamental para muchos aspectos de la función de una célula, como la división y la diferenciación, la respuesta a estímulos fisiológicos, o la movilidad celular. Nosotros usamos la levadura *S. pombe* como organismo modelo para estudiar cómo se genera y mantiene la forma de una célula. *S. pombe* crece de forma polarizada por extensión de las puntas y se divide por el centro tras la contracción un anillo de actomiosina. El citoesqueleto de microtúbulos (MTs) es esencial para la arquitectura celular de esta levadura. Su desorganización produce defectos en el posicionamiento del núcleo y del plano de división, así como defectos en el establecimiento de los sitios de crecimiento. Para estudiar los mecanismos básicos responsables de posicionar el núcleo y el sitio de división en el centro de la célula hemos desarrollado un método para desplazar por centrifugación el núcleo. Tras el desplazamiento del núcleo en células en interfase observamos que éste se recentra, dependiendo de MTs, en unos 15 minutos. Si las células entran en mitosis antes de que el núcleo se recentre, se dividen asimétricamente, coincidiendo siempre el sitio de división con la posición del núcleo. El desplazamiento del núcleo al principio de mitosis induce la formación de un anillo extra de actomiosina cuya posición coincide con la nueva posición del núcleo. Estos datos demuestran que el núcleo determina el sitio de división. La proteína con homología a la "*anillin*" humana, Mid1, pordría ser la señal que acopla la posición del núcleo con el sitio de división. Siguiendo este método de centrifugacion es posible generar células anucleadas. Soprendentemente, estas células sin núcleo retienen la capacidad de nuclear MTs, organizarlos en haces antiparalelos, posicionar las zonas de solapamiento en el centro de la célula, definiendo asi un "centro", y transportar vectorialmente factores de polaridad, definiendo así "los extremos" de la célula. Este simple modelo nos va a permitir estudiar principios básicos de auto-organización y la generación de la forma de una célula.

El papel de la proteín quinasa C en longevidad y en otros aspectos del desarrollo de *Caenorhabditis elegans*

Monje, J.M., Fidalgo, M.A., y Muñoz, M.J.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Universidad Pablo de Olavide, Crta Utrera Km1. 41013.

En condiciones adecuadas para el crecimiento, el nematodo *Caenorhabditis elegans* se desarrolla a adulto fértil en tan sólo tres días, permaneciendo vivo de media otros 15 días antes de morir de viejo; Sin embargo, si al nacer las condiciones ambientales no son favorables para el crecimiento y la reproducción, C. elegans se desarrolla a un estadio conocido como “dauer” cuya función es de dispersión y supervivencia, pudiendo sobrevivir durante meses. La falta de función de los genes de la ruta de la insulina/IGF hacen que el nematodo entre constitutivamente en dauer. Alelos hipomorfos de estos genes permiten el desarrollo hasta adulto en condiciones ambientales adecuadas. Estos adultos mutantes son longevos, sugiriendo que al menos el programa de incremento de longevidad de dauer permanece activo en estos mutantes. Nuestro grupo ha encontrado un mutante que suprime la entrada en dauer y el incremento de longevidad que generan determinados alelos del receptor de insulina/IGF. Mediante clonación posicional hemos determinado que este gen codifica para la proteína quinasa C tipo novel (pkc-1). La caracterización de este gene será descrita en esta presentación.

Cambios apoptóticos y expresión de "Caspasa-3-like" en la muerte celular del tapetum durante el desarrollo del polen

Chakrabarti, N., Cortés-Eslava, J., Rodríguez-Huete, A., Testillano, P.S., y Risueño, M.C.

Desarrollo Vegetal y Arquitectura Nuclear, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

La muerte celular programada (PCD) es un proceso fisiológico clave para la eliminación selectiva de células durante el desarrollo, senescencia, o la respuesta a estrés, tanto en animales como en plantas. El proceso más común de PCD es la apoptosis, la cual está bien caracterizada en células animales pero las vías d emuerte en plantas están menos definidas, aunque hay cada vez más evidencias de sus analogías con la apoptosis animal. En este trabajo, se ha analizado el proceso de PCD en células del tapetum, tejido nutricio que acompaña el desarrollo del polen en *Nicotiana tabacum* L. y *Capsicum annuum* L, caracterizándose una secuencia temporal de cambios apoptóticos en el tapetum en etapas concretas del desarrollo del polen. Mediante citoquímica e inmunocitoquímica y análisis al CLSM, se han analizado los cambios en citoplasma y núcleo, condensación cromatínica, localización del Citocromo C, y distribución de RNA y snRNAs con anticuerpos específicos (anti-Cit C, anti-RNA y anti-TMG). Los resultados muestran en las células del tapetum, en etapas específicas de la microsporogénesis, alta condensación cromatínica y lobulación nuclear, liberación del Citocromo C al citoplasma, reorganización de componentes intercromatínicos y formación de cuerpos apoptóticos. Se ensayaron anticuerpos contra la forma activa de caspasa-3 ("Cleaved Caspase-3") mediante inmunofluorescencia, obteniéndose una intensa señal citoplásmica únicamente en el tapetum, desde la fase de microspora vacuolada hasta la de polen bicelular. El "Western blot" mostró que el anticuerpo reconocía una banda de peso similar a la Caspasa-3 activa de animales.

Financiado por Proyectos MEC BFU2005-01094 y AGL2005-05104. N.Ch. y J.C.E. son receptoras de becas del MEC para Estancias en España de Doctores Extranjeros (SB2003-0273) y de Investigadores en Año Sabático (SAB2003-0229) respectivamente.

"Key Experiments in Practical Developmental Biology. Marí-Beffa, M., and Knight, J. (eds.) (2005) Cambridge University Press. Cambridge: A teaching experience"

Marí-Beffa, M.

Department of Cell Biology, Genetics and Physiology. Faculty of Science. University of Málaga. 29071. Málaga. Spain.

Forty seven developmental biologists have written in this book twenty seven chapters describing pioneer experiments in the field (foundational to Developmental Biology and Evo-Devo). This book intends to establish a bridge between experimental labs in Developmental Biology and laboratory classes at the undergraduate and post-graduate levels. All chapters use a similar format: Introduction, Material and Methods, Outline of Experiments, Expected Results and Discussion. Alternative Exercises are also proposed in order to permit laboratory instructors to carry out a more "inquiry-based" lab format. The chapters also list Teaching Concepts, Degree of Difficulty, Potential Sources of Failure and Time Required for the Experiments to help instructors during the class. Most experimental models are used: *Dictyostelium*, sea urchin, nematode, fly, frog, fish, chick, mouse and *Arabidopsis thaliana* development. Amphibian limb, hydra and planarian regeneration are also studied. Moreover, mice embryonic stem cell technique is also described in detail. Finally, computational modelling exercises are also proposed. Many chapters are written by original scientists who have performed important experiments in the discipline. This is the first book in which original scientists explain foundational experiments to students at the University, providing their original experimental protocol in a subject and not technical-driven manner.We hope this book will be essential for inspiring laboratory classes at Universities as a complement to Developmental Biology theoretical texts.

HOMENAJE A
ANTONIO GARCÍA-BELLIDO

Control of size and shape in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*

García-Bellido, A.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C. - Universidad Autónoma de Madrid.

Organ size and shape are species specific. Both parameters result from the coordination of cell proliferation, cell death and arrangement of cells in specific patterns during development. Our knowledge about the genetic basis of the cell cycle and cell survival has been greatly advanced, but the systemic relationships of gene expression patterns in cells with cell proliferation and cell arrangement in developing organs are only now beginning to be established. *Drosophila* imaginal discs are a classical model system for studying general mechanisms involved in the control of growth, shape and patterning of organs. The imaginal discs are epithelial structures that originate from the embryonic ectoderm and give rise to most adult organs. Two different views ("externalistic" vs "internalistic") have been proposed to provide cells their positional identity in the imaginal discs and therefore their cellular properties (rate of cell proliferation, orientated cell division, cell differentiation…). In both models the differences of positional values between cells elicit intercalary cell proliferation to reach a normal size and pattern, although essential discrepancies exist. During the last decades, several findings support the notion that local cell interactions, between neighbouring cells, globally modulates the growth and orientation of cell division in the wing blade; favouring the internalistic view to explain the control of growth and shape of organs.

Pósters

DESARROLLO VEGETAL

Alteración del patrón radial del tallo de *Arabidopsis* por un alelo semidominante del gen *INCURVATA4*

González-Reig, S., Ochando, I., Ripoll, J.J., Vera, A., y Martínez-Laborda, A.

División de Genética. Universidad Miguel Hernández de Elche. Campus de Sant Joan d'Alacant. Ctra. de Valencia s/n. 03550-Sant Joan d'Alacant.

Alelos semidominantes, de ganancia de función, de los genes HD-Zip III presentan resistencia a la regulación negativa por microRNA. Hemos observado que los homocigotos para el alelo semidominante *icu4-1* presentan, con penetrancia del 20%, una reducción del número de fascículos vasculares en el tallo. Este resultado es coincidente con el fenotipo de una de las clases de plantas transgénicas 35S-*ICU4*-G189D, que expresan constitutivamente el cDNA mutante. Las plantas de esta clase presentan alteración moderada en la polaridad de las hojas, similares a las del mutante *icu4-1*. Otra clase de plantas trasgénicas 35S-*ICU4*-G189D, con transformaciones más intensas en la polaridad de las hojas, muestran un fenotipo distinto en los fascículos, con cambio de la polaridad normal colateral (floema cerca de la periferia del tallo y xilema en posición más interna) a una polaridad anfivasal (xilema rodeando al floema). Combinaciones mutantes del alelo *icu4-1* con otras mutaciones que afectan a la polaridad de las hojas dan lugar a sinergia en el patrón radial del tallo. Además, el fenotipo del mutante *icu4-1* incrementa con tratamientos que afectan a la vía de señalización por auxina, observándose menor número de fascículos o la formación de fascículos anfivasales. Los resultados sugieren la existencia de un mecanismo de información posicional para el establecimiento del patrón radial del tallo en el cual estarían participando los genes HD-Zip III y las auxinas.

Genes con motivos KH de unión a RNA y regulación de la morfogénesis y la floración en *Arabidopsis*

Ripoll, J.J.[1,3], Pérez-Amador, M.A.[2], Alonso-Cantabrana, H.[1,4], González-Reig, S.[1], Carbonell, J.[2], Martínez-Laborda, A.[1], y Vera, A.[1]*

[1]División de Genética, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan, 03550-Alicante.
[2]Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Avda. de los Naranjos s/n. 46022-Valencia.
[3]Dirección actual: Section of Cell and Developmental Biology, Division of Biological Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093-0116 USA.
[4]Dirección actual: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Avda. de los Naranjos s/n. 46022-Valencia.

La transición floral es un proceso de desarrollo exquisitamente regulado mediante una serie de rutas genéticas interconectadas, que canalizan diferentes estímulos para su inducción. Entre ellas, la llamanda "ruta autónoma" está constituida por genes cuyos productos reducen el nivel de transcrito de *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), un gen que codifica un factor de transcripción de tipo MADS-box que actúa como un represor general de la floración. Un regulador negativo de *FLC* que opera en esta ruta es la proteína de unión a RNA con dominios KH (K-homology) FLOWERING LOCUS K (FLK). Aquí mostramos que FLK desempeña, además, un papel en la morfogénesis de los órganos de la planta, puesto que su pérdida de función rescata de forma dominante los fenotipos foliares derivados de lesiones en *PEPPER* (*PEP*), un paralogo cercano previamente involucrado en el desarrollo vegetativo y del gineceo. Por añadidura, las mutaciones *pep* rescatan el fenotipo de floración tardía de *flk*. Este efecto está mediado por *FLC*, ya que la expresión constitutiva de *PEP* determina niveles elevados del transcrito de *FLC* y un considerable retardo de la floración. Nuestros resultados ponen de manifiesto la implicación dual de ambas proteínas KH tanto en la morfogénesis de los órganos, como en la regulación del tiempo de floración, e indican que *PEP* es un nuevo regulador negativo de la transición floral, al márgen de su papel en el desarrollo de órganos concretos.

A leucine-rich repeat protein kinase regulates stomatal pattern in Arabidopsis

Cañamero, R.C., and Serna, L.

Facultad de Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, E-45071 Toledo, Spain.

Stomata are critical structures for plant productivity because they regulate CO2 and water vapour exchange between the plant and the atmosphere. In Arabidopsis, stomatal production and patterning are regulated by three genes that might act in the same pathway: *TOO MANY MOUTHS* (*TMM*), *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1* (*SDD1*) and *YODA* (*YDA*) 1,2. SDD1 is a predicted subtilisin-like protease that is probably secreted. It is accepted that extracellular ligands modified by SDD1 bind to the TMM leucine-rich repeat receptor-like protein, resulting in the activation of the MAPKK kinase YDA. Because TMM has no kinase domain linking it to the interior, it is hypothesized that it needs to dimerize with a co-receptor that would provide such a domain. Results to date unravelling the nature of a leucine-rich repeat protein kinase that regulates stomatal production and patterning in Arabidopsis will be presented.

1.- Sack, F. (2004). Yoda would be proud: valves for land plants. *Science* **304**, 1461-1462.
2.- Serna, L. (2004). Good neighbours. *Nature* **430**, 302-304.

Iniciación y distribución de primordios de raíz lateral en raíces primarias de plantas silvestres y plantas transgénicas *agcr1* de *A. thaliana*

Casimiro, I., Calvo, V., y Casero, P.J.

Universidad de Extremadura. Facultad de Ciencias. Depto. Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal.

El interés que supone la utilización de plantas transgénicas *agcr1* radica en el hecho de que el gen *GCR1* es el único identificado en *Arabidopsis* que presenta similitudes con los genes que codifican proteínas transmembrana (proteínas-G) en otros organismos, algunas de estas proteínas están relacionadas con transportadores de membrana hormonales. Se han analizado la distribución y la densidad de PRL (primordios de raíz lateral) en raíces primarias intactas de plantas silvestres (Wt-Col) y plantas transgénicas*agcr1* de *A.thaliana* de 6 y 11 días de crecimiento. Al cabo del experimento las raíces primarias de plantas transgénicas resultaron significativamente más cortas que las de las plantas silvestres. En cuanto a la densidad de primordios de raíz lateral (PRL/mm), cabe destacar que las raíces primarias de plantas transgénicas agcr1 presentaron una densidad de primordios significativamente menor que las plantas silvestres durante los primeros 6 días de crecimiento. Los resultados de densidad de PRL en raíces primarias de 11 días muestran un incremento en el número de PRL/mm en los distintos intervalos tanto en raíces primarias silvestres como transgénicas. No obstante, al comparar la edad de los distintos intervalos analizados en los dos grupos de raíces se observa que, aunque las raíces primarias de las plantas transgénicas tengan menor capacidad para producir PRL que las raíces primarias de plantas silvestres hasta los 6 días, recuperan la capacidad de producción de PRL con el tiempo. De hecho en raíces primarias de 11 días de crecimiento la densidad de PRL en los intervalos más apicales es similar en plantas silvestres y trangénicas. Estos resultados sugieren que el gen *GCR1* podría estar implicado en procesos de regulación hormonal sobretodo en las primeras etapas del desarrollo del sistema radicular.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Extremadura. II Plan Regional de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación (2PR03C010).

Interacción entre las giberelinas y la luz para el establecimiento de la fotomorfogénesis

Gallego-Bartolomé, J.[1], Alabadí, D.[1], García-Cárcel, L.[1], Orlando, L.[1], Rubio, V.[2], Espinosa, A.[3], Deng, X.W.[2], y Blázquez, M.A.[1]

[1]Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Valencia.
[2]Yale University, New Haven, CT (EE.UU.).
[3]Centro Nacional de Biotecnología (UAM-CSIC), Madrid.

Tras la germinación, las plantas "eligen" entre dos programas de desarrollo muy diferentes dependiendo de la presencia (fotomorfogénesis, FM) o ausencia de luz (escotomorfogénesis). En Arabididopsis, el primero se caracteriza por un crecimiento reducido del hipocotilo, expansión de los cotiledones, generación de nuevos órganos e inducción de un gran número de genes (por ej. los necesarios para la fotosíntesis). Por el contrario, la escotomorfogénesis comprende el alargamiento del hipocotilo, y el mantenimiento del gancho apical y de los cotiledones plegados. El mecanismo molecular que mantiene reprimida la FM en la oscuridad incluye una ruta de señalización dependiente de COP1, y también participan hormonas como las giberelinas (GA) y los brasinosteroides. El papel de COP1 es marcar para su degradación por el proteasoma factores de transcripción (HY5, HYH, etc) necesarios para la expresión de genes regulados por luz. Nosotros hemos encontrado que las GA reprimen la FM mediante su interacción con esta ruta de señalización. En concreto, HY5 es genéticamente necesario para la desrepresión de la FM en ausencia de GA, y estas hormonas promueven la degradación de HY5 in vivo. La participación de las GA en la represión de la FM en la oscuridad es fisiológicamente relevante, como indican las siguientes observaciones: (1) La aparición de la luz provoca una bajada rápida en los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de GA, un aumento en la de los de inactivación y una estabilización temporal de RGA –un elemento negativo de la señalización por GA; (2) La aplicación de GA durante la aparición de la luz retrasa la puesta en marcha de la FM; y (3) La sensibilidad a GA durante la represión de la FM en la oscuridad es un proceso sometido a variación genética natural como mecanismo para la adaptación de variedades a sus correspondientes hábitats.

Generación de una colección de mutantes de *Medicago truncatula*: caracterización fenotípica del desarrollo de inflorescencias, flores y frutos.

Rochina, M.C., Benlloch, R., Caballero, T., Madueño, F., Cañas, L.A., y Beltrán, J.P.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas UPV-CSIC. Departamento de Biología del Desarrollo. Valencia.

Realizamos un ensayo de mutagénesis a gran escala de *Medicago truncatula* cv. Jemalong para generar una población de líneas M1 (Benlloch, 2005). Utilizamos etilmetanosulfonato (EMS) como agente mutágeno. Los fenotipos derivados de las mutaciones producidas por el EMS, normalmente recesivas, se observan en la generación M2, ya que en un 25% de la población la mutación se encuentra en homocigosis. Las semillas procedentes de la población M1 (813 líneas) se recogieron de manera individualizada (estrategia de "pedigree"). Para rastrear la población M2 se sembraron 20 plantas de cada línea M1 generada. El análisis de las poblaciones M2 nos ha permitido la identificación de mutantes afectados en el desarrollo vegetativo y/o floral, tales como el tiempo de floración, el desarrollo de la flor y del fruto, la arquitectura de la planta o la forma de la hoja. Hasta la fecha se han estudiado 328 líneas M2 y se han aislado 140 plantas con mutaciones de interés, de las cuales 42 presentan alteraciones en la flor. Con todas ellas estamos construyendo una base de datos en la que se recogen sus características fenotípicas, incluyendo estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM).

Benlloch, R. (2005). *Medicago truncatula* (Gaernt.) como especie modelo para el análisis genético molecular del desarrollo floral en leguminosas. Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.

TCU1 codifica una nucleoporina necesaria para el desarrollo foliar en *Arabidopsis thaliana*

Alonso-Peral, M.M., Ferrández-Ayela, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

En una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología foliar, hemos aislado una estirpe a la que hemos denominado *transcurvata1-1* (*tcu1-1*), dado que el margen de sus hojas vegetativas se recurva hacia el envés oblicuamente a la vena primaria. Aunque el tamaño de los cotiledones del mutante *tcu1-1* es inferior al silvestre, ocurre lo contrario con la longitud del hipocotilo y sus células epidérmicas, los peciolos y los pelos radiculares. Este mutante florece siete días antes que el tipo silvestre, es hipersensible a la auxina sintética 2,4-D, y sus cotiledones y peciolos forman con el tallo un ángulo agudo. Algunos de estos rasgos sugieren que *tcu1* podría tener alterada la respuesta fotomorfogénica. Hemos clonado posicionalmente el gen *TCU1*, que codifica una nucleoporina presuntamente implicada en el transporte nucleocitoplásmico, y hemos identificado dos alelos insercionales, a los que hemos denominado *tcu1-2* y *tcu1-3*. Estamos llevando a cabo un análisis de las interacciones genéticas entre las mutaciones *tcu1* y alelos de algunos genes que participan en el transporte nucleocitoplásmico o que lo requieren.

El gen *ICU2* participa en la herencia epigenética en *Arabidopsis thaliana*

González-Bayón, R., Barrero, J.M., del Pozo, J.C.[1], Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.
[1]Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid.

Hemos identificado tres alelos del gen *INCURVATA2* de *Arabidopsis thaliana.* Uno de ellos, *icu2-1*, es recesivo e hipomorfo y causa floración temprana e hiponastia foliar, así como transformaciones homeóticas entre órganos florales, similares a las causadas por los alelos de insuficiencia de función del gen de identidad de órgano floral *APETALA2*. Los alelos nulos *icu2-2* e *icu2-3* son recesivos y letales embrionarios. Mediante un análisis transcriptómico de ARN extraido de las hojas del mutante *icu2-1* y su posterior validación mediante RT-PCR cuantitativa, hemos constatado la desrepresión ectópica de los genes *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, *SEPALLATA3*, *CAULIFLOWER*, *FRUITFULL* y *FLOWERING LOCUS T*, entre otros. Además, la obtención de dobles mutantes nos ha permitido establecer que las mutaciones *curly leaf*, *terminal flower2* y *embryonic flower2* interaccionan con *icu2-1*. Hemos clonado posicionalmente el gen *ICU2*, comprobando que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa α. Nuestros resultados genéticos y moleculares indican que el producto del gen *ICU2* participa en la replicación del ADN y en la memoria celular mediada por la cromatina. Estamos estudiando las interacciones entre las proteínas ICU2 y TFL2 en la estirpe silvestre y el mutante *icu2-1*.

Análisis genético y molecular del gen *DEN30* de *Arabidopsis thaliana*

Mollá-Morales, A., Robles, P., Guillo, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Los mutantes *denticulata* (*den*) de *Arabidopsis thaliana* pertenecen a 30 grupos de complementación y se caracterizan fundamentalmente por las indentaciones de los márgenes de sus hojas vegetativas. El mutante *den30* presenta además una epidermis foliar rugosa y las células de su mesófilo son más grandes y menos numerosas que las del tipo silvestre. El análisis morfométrico de sus hojas indica que se expanden menos que las silvestres a lo largo de los ejes mediolateral y proximodistal. Esta reducción de la expansión podría deberse a una perturbación del establecimiento de las identidades dorsal y ventral, ya que los dobles mutantes *den30 as1* (*asymmetric leaves1*) y *den30 as2* presentan sinergia fenotípica y ocasionalmente hojas radializadas. Estos fenotipos sinérgicos sugieren que *DEN30* participa en la ruta de desarrollo controlada por los microARN 165 y 166 y por los genes *AS1* y *AS2*, cuyos productos son, respectivamente, un factor de transcripción de tipo MYB y una proteína de localización nuclear implicados en la represión en las hojas de los genes *KNOX* responsables de la identidad meristemática. Estamos estudiando los niveles de expresión de los genes *KNOX* mediante PCR cuantitativa en el mutante *den30* y el doble mutante *den30 as1*. La cartografía de alta resolución de *DEN30* nos ha permitido establecer que radica en el cromosoma 4, en un intervalo candidato que incluye 22 genes.

Clonación posicional de mutaciones no señalizadas en *Arabidopsis thaliana*

Lozano, F.M., Mollá-Morales, A., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Hemos puesto en marcha un servicio de cartografía génica, automatizada y de alta resolución, de mutantes no señalizados. Este servicio trabaja con muestras remitidas por los grupos de investigación que constituyen la comunidad española de investigadores de *Arabidopsis thaliana*, que nos envían 50 individuos de la F_2 de un cruzamiento entre una planta homocigótica para una mutación de interés y un ecotipo distinto de su ancestro silvestre. Su ADN es extraído por el servicio de cartografía, para llevar a cabo un análisis del ligamiento a 32 microsatélites polimórficos, que se realiza mediante dos amplificaciones de PCR múltiple, en cada una de las cuales se ensayan simultáneamente 17 y 15 marcadores, mediante marcaje fluorescente y detección semiautomatizada, lo que permite determinar la posición de mapa de la mutación a estudio dentro de un intervalo de unos 15 cM. La cartografía de alta resolución se realiza en una segunda etapa, en la que se emplean 450 plantas F_2 adicionales para identificar, mediante análisis del ligamiento a marcadores moleculares de varios tipos, un cóntigo de dos o tres clones BAC correspondiente al segmento del genoma en el que radica el gen afectado por la mutación a estudio. Hemos completado 56 cartografías de baja resolución y 24 de alta resolución, analizado un total de 10.198 muestras.

Las mutaciones *hve* evidencian la relación entre la ubiquitinación y el desarrollo vascular en *Arabidopsis thaliana*

Alonso-Peral, M.M., Candela, H.[2], del Pozo, J.C.[1], Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.
[1]Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain.
[2]Dirección actual: Plant Gene Expression Center, University of California, Berkeley, Albany 94710, USA.

En una búsqueda de variantes naturales de *Arabidopsis thaliana*, hemos identificado la mutación recesiva *hemivenata-1* (*hve-1*), que simplifica considerablemente el patrón de venación en las hojas vegetativas y los cotiledones. Tras clonar posicionalmente el gen *HVE*, hemos establecido que el alelo *hve-1* altera el procesamiento de sus transcritos y genera un patrón de venación indistinguible del de *hve-2* y *hve-3*, que son insercionales y nulos. El porte de la inflorescencia y la fertilidad son mucho menores en los mutantes *hve-2* y *hve-3,* lo que sugiere que *hve-1* es hipomorfo. La sencillez de la red vascular de las hojas de las plantas *hve* parece deberse a una reducción en el número de células que son incorporadas a la venación en una etapa temprana del establecimiento del patrón. Hemos demostrado *in vitro* que el producto de HVE, la proteína CAND1, se une a la CULINA1, y que las redes vasculares de los mutantes *axr1* y *hve* son similares, lo que sugiere que la señalización de la auxina mediada por ubiquitinación es necesaria para la correcta formación del patrón de venación de los cotiledones, las hojas vegetativas, los pétalos y los sépalos. Nuestros análisis de dobles mutantes y plantas transgénicas indican que el transporte y la percepción de la auxina actúan independientemente en el establecimiento del patrón de venación foliar, y que *HVE* se expresa antes que *ATHB-8*, en una ruta en la que participa *AXR1* pero no *LOP1*, *PIN1*, *CVP1* ni *CVP2*.

SCA3 es esencial para la biogénesis de los cloroplastos y el desarrollo del mesófilo en *Arabidopsis thaliana*

Quesada, V., Hricová, A., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Se ha demostrado en varias especies vegetales que el producto del gen nuclear *RpoTp* es una polimerasa de ARN que transcribe parte del genoma del cloroplasto. Hemos clonado posicionalmente el gen *SCABRA3* (*SCA3*), estableciendo que cifra la RpoTp de *Arabidopsis thaliana*. Hemos identificado un alelo hipomorfo (*sca3-1*) y dos muy probablemente nulos (*sca3-2* y *sca3-3*), que dificultan el crecimiento y reducen la pigmentación de los cotiledones, las hojas, los tallos y los sépalos. En los mutantes *sca3* la superficie foliar es extremadamente irregular, aunque el tamaño y la morfología de las células epidérmicas son normales, y las células del mesófilo son más heterogéneas y están menos densamente empaquetadas que las del tipo silvestre. El gen *SCA3* se requiere para el normal desarrollo de los cloroplastos, ya que su tamaño y número en las plantas *sca3-2/sca3-2* es sustancialmente inferior al silvestre y su morfología es aberrante. Como consecuencia, el crecimiento fotoautotrófico de los individuos *sca3-2/sca3-2* está alterado. Hemos realizado un análisis de micromatrices validado mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), constatando diferencias significativas entre el mutante *sca3-2* y el tipo silvestre en cuanto a la expresión de varios cientos de genes nucleares, de los que 83 cifran proteínas del cloroplasto. Los análisis de Northern y qRT-PCR del mutante *sca3-2* indican la existencia de alteraciones en la expresión de los genes *rpoB*, *rpoC1*, *clpP* y *accD* del cloroplasto, así como en la de los parálogos nucleares de *SCA3*, *RpoTm* y *RpoTmp*. Nuestros resultados confirman la función esencial de los cloroplastos en la morfogénesis de la hoja y sugieren que la polimerasa RpoTp es necesaria para el control de la proliferación celular en el mesófilo.

El gen nuclear *RUG2* de *Arabidopsis thaliana* codifica un presunto factor de terminación de la transcripción mitocondrial implicado en la organogénesis foliar

Quesada, V., Hricová, A., Pérez-Marcos, R., Graciá-Martínez, E., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Las hojas del mutante *rug2-1* de *Arabidopsis thaliana* son variegadas, con alternancia de regiones verdes y pálidas, así como más redondeadas, pequeñas y protuberantes que las del tipo silvestre. El tallo, las hojas caulinares, los sépalos y las silicuas están parcialmente despigmentados en las plantas *rug2-1/rug2-1*, cuyas hojas vegetativas presentan una forma relativamente normal, a pesar de que su mesófilo es muy pobre en células, y sus cloroplastos muestran una morfología aberrante y una dismunición de su tamaño y número, que es máxima en las zonas despigmentadas. El fenotipo del mutante *rug2-1* es termosensible, suprimiéndose totalmente a 16°C, mientras que le resulta letal el cultivo a 26°C. Hemos clonado posicionalmente el gen *RUG2*, cuyo producto proteico presenta homología con los factores de terminación de la transcripción mitocondrial de otros eucariotas. Hemos identificado un alelo insercional de *RUG2* (*rug2-2*), y otro de un parálogo de *RUG2* (At4g38160), al que hemos denominado *RUG3*. Estamos llevando a cabo un análisis de interacciones genéticas entre las mutaciones *rug2* y otras que causan fenotipos morfológicos similares. Nuestros resultados indican que la perturbación de genes nucleares cuyos productos actúan en la mitocondria puede afectar al desarrollo de los cloroplastos y alterar la morfogénesis foliar.

Clonación posicional de los genes *VEN4* y *VEN5* de *Arabidopsis thaliana*

González-Bayón, R., Lozano, F.M., Campello, L., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

En una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología foliar, hemos aislado quince estirpes cuyo fenotipo hemos denominado Venosa (Ven). Presentan una nerviación foliar muy manifiesta, como consecuencia de alguna perturbación en la distribución espacial de los pigmentos fotosintéticos, cuyo resultado es que las células que circundan a la vena primaria y las secundarias son verdes mientras que los tejidos intervenales son amarillentos. El análisis genético de las mutaciones *ven* indica que corresponden a seis genes (*VEN1*-*VEN6*), cuyas posiciones de mapa hemos determinado mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos. Hemos clonado posicionalmente dos de ellos, comprobando que *VEN4* codifica una presunta fosfohidrolasa y *VEN5* una proteína de la envuelta del cloroplasto. Estamos estudiando las interacciones entre las mutaciones *ven4*, *ven5* y otras que causan fenotipos relacionados.

La epidermis y el mesófilo contribuyen desigualmente a la forma final de las hojas de *Arabidopsis thaliana*

González-Bayón, R., Quesada, V., Robles, P., Campello, L., Ponce, M.R., y Micol, J.L.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* muchos mutantes con una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo pálido. Uno de estos mutantes fue denominado *reticulata-1* (*re-1*) por Redei en 1964 y ha sido utilizado durante décadas como marcador genético clásico para el análisis de ligamiento. Hemos aislado seis alelos recesivos del gen *RE*, que han sido caracterizados a la vez que *re-1*, demostrando que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas y nulas en este gen perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. El parálogo más cercano a *RE* es At5g22790, al que hemos denominado *RE2*, cuyos alelos nulos no causan ninguna alteración morfológica. El análisis de la progenie de varios cruzamientos *re/re* × *re2/re2* indica que los genotipos *re/re;re2/re2* son letales, y que las plantas *re/re;RE2/re2* aparecen en una proporción muy inferior a la esperada. El fenotipo de estas últimas es sinérgico y sugiere que *RE* y *RE2* son redundantes y necesarios para la organogénesis foliar y el desarrollo reproductivo y embrionario. Estamos analizando los patrones de expresión espacial de estos genes en la estirpe silvestre, así como el transcriptoma de las plantas *re/re*, *re2/re2* y *re/re;RE/re2*.

Caracterización de dobles mutantes de *Arabidopsis thaliana* en los que se modifica el fenotipo Argonaute1

Aguilera, V., Micol, J.L., y Ponce, M.R.

División de Genética e Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

Hemos cruzado estirpes portadoras de mutaciones no alélicas en genes de la maquinaria de los microARN y algunas de sus dianas, encontrando en todos los casos sinergia fenotípica en la progenie F_2. Esta observación sugiere que la mutagénesis de estos mutantes podría servir para identificar nuevos genes cuyos productos sean microARN, formen parte de la maquinaria que los produce y procesa, o sean sus dianas. Con este fin, estamos llevando a cabo una búsqueda de modificadores del fenotipo del mutante *ago1-52*. Hemos tratado con metanosulfonato de etilo 67.500 semillas *ago1-52/ago1-52*, portadoras de un alelo recesivo, débil, viable y relativamente fértil del gen *ARGONAUTE1*, que codifica un componente de la maquinaria de silenciamiento génico postranscripcional mediada por microARN. Hasta ahora, hemos sometido a escrutinio 3.890 plantas M_2, encontrando 370 presuntos dobles mutantes, que hemos asignado a varias clases fenotípicas, en las que el fenotipo asociado a *ago1-52* se acentúa o debilita. Estamos estudiando estos presuntos dobles mutantes, determinando la penetrancia y expresividad de su fenotipo, caracterizándolos morfológicamente y retrocruzándolos por su ancestro silvestre, antes de someterlos a análisis de complementación y de ligamiento.

CÉLULAS TRONCALES

Análisis del papel tejido específico del factor de transcripción Pitx2 durante el desarrollo cardíaco

Chinchilla, A., Hernández-Torres, F., Aránega, A., y Franco, D.

Grupo de Desarrollo Cardiovascular, Departamento de Biologia Experimental, Universidad de Jaen, Jaen, España.

El primer organo que presenta una asimetría morfologíca durante el desarrollo es el corazon. Sin embargo, la cascada de señalización molecular izquierda-derecha se inicia en estadios mas tempranos del desarrollo. Nosotros hemos caracterizado la expresión de Pitx2 durante la cardiogenesis y hemos visto que Pitx2 se expresa en la mitad izquierda del tubo cardiaco lineal. Conforme avanza la cardiogenesis, vemos que Pitx2 confina su expresión al lado izquierdo en el miocardio atrial y tracto de entrada, pero pasa a expresarse en la porcion dorso-ventral del miocardio ventricular. Se ha demostrado que los mutantes nulos sistemicos Pitx2 tienen un papel critico durante la cardiogenesis, dando lugar a distintos fenotipos como el DORV. En nuestro laboratorio, estamos interesados en entender el papel espacio/temporal de Pitx2 durante la cardiogenesis. Asi, hemos desarrollado un modelo *in vitro* de sobreexpresion de Pitx2 en cardiomiocitos derivados de celulas madre embrionarias, que nos ha permitido demostrar el papel esencial que juega Pitx2 en la proliferación (ciclo celular) *vs* diferenciación del músculo cardiaco. Ademas, hemos desarrollado mutantes condicionales nulos tejido-especificos de miocardio ventricular (Mlc2v-Cre), miocardio atrial (ANF-Cre) y celulas endoteliales (Tie2-Cre). Hemos observado que la perdida de funcion de Pitx2 en el miocardio ventricular produce tanto defectos en el tracto de salida y arcos aorticos como una localizacion cardiaca ectopica. Ademas, la carencia de Pitx2 en el miocardio atrial esta asociada a defectos en el tracto de salida y a la localizacion ectopica del corazon. La falta de Pitx2 en componentes endoteliales parece ser irrelevante. Actualmente, estamos cuantificando la expresión de distintos factores de transcripcion y de crecimiento en estos mutantes nulos condicionales mediante PCR a tiempo real, asi como mediante hibridación *in situ* para analizar espacio/temporalmente su expresion. Dichos resultados seran comentados.

ORGANOGÉNESIS

Regulación de la expresión de dos nuevos mRNAs quimera generados a partir de los genes de *TIROSINA HIDROXILASA* y de *INSULINA*

Bártulos Encinas, O.[1], Hernández Sánchez, C.[1], Valenciano González, A.[2], Mansilla Aparicio, A.[1], y De Pablo Dávila, F.[1]

[1]Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), C/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.
[2]Departamento de Fisiología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

La secuenciación de genomas de varias especies, ha puesto de manifiesto la ausencia de relación entre número de genes presentes en un organismo y su complejidad estructural y funcional. Nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica, regulación posttranscripcional, traduccional, y las diversas modificaciones posttraduccionales, podrían contribuir a la generación de complejidad y diversidad a lo largo de la escala evolutiva. En nuestro laboratorio hemos descrito en embriones de pollo y codorniz, la existencia de dos mRNAs quimera (TH-INS1 y TH-INS2), generados por la fusión entre los mRNA de tirosina hidroxilasa (TH) y de la insulina. La expresión del transcrito más abundante (TH-INS1) está regulada en el desarrollo embrionario y es específica de tejido, siendo su abundancia relativa mayor en embrión en neurulación que en sistema nervioso o páncreas embrionario tardío. Sus niveles aumentan de gastrulación a neurulación. Las proteínas generadas a partir de TH-INS1 y 2 comparten con la TH canónica 424 de los 491 aminoácidos totales, pero carecen del dominio de tetramerización. Éste permite la actividad óptima de la TH. La actividad enzimática de TH-INS1 y 2 es unas seis veces inferior a la obtenida por la TH canónica. Este sería un mecanismo de regular a la baja la actividad funcional de la TH en aves durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Proponemos que estas quimeras son un nuevo mecanismo de regulación de los niveles funcionales de TH y de insulina.

Fasciculina II controla la función de EGFR durante proliferación celular en discos imaginales de *Drosophila*

Velásquez, E.M., y García-Alonso, L.

Instituto de Neurociencias de Alicante CSIC-UMH. Universidad Miguel Hernandez, Sant Joan d'Alacant, Alicante 03550 Spain.

Las moléculas de la superfamilia de las immunoglobulinas tipo NCAM y L1-CAM han mantenido funciones conservadas a lo largo de la evolución desde artrópodos a cordados. Aunque la función de estas proteínas durante el desarrollo del sistema nervioso ha sido ampliamente caracterizada, su función en etapas más tempranas ha sido mucho menos explorada. Aquí presentamos un análisis de mosaicos morfogenéticos utilizando los sistemas MARCM y FLP-OUT para caracterizar la función del ortólogo de NCAM en Drosophila, Fasciculina II, en condiciones de falta y exceso de función. Nuestros resultados indican que Fasciculina II controla de forma autónoma celular la activación de EGFR durante la fase de proliferación celular en el disco imaginal de ala. Asi mismo nuestro trabajo muestra la existencia adicional de un componente noautónomo en la función de Fasciculina II, involucrado en la coordinación del crecimiento entre las células del epitelio del disco imaginal. En contraste a la situación durante guía axonal donde Fasciculina II opera a través de EGFR y FGFR, en las fases proliferativas del epitelio de los discos imaginales Fasciculina II parece completamente independiente de FGFR.

Patrón de expresión de Sonic hedgehog en la placa alar del prosencéfalo secundario del pollo

Ferrán, J.L., Bardet, S.M., Sánchez- Arrones, L., Medina, L., y Puelles, L.

Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

Sonic hedgehog (Shh) es una molécula señalizadora clave en la especificación de las identidades celulares ventrales del tubo neural de vertebrados. Debido a que es una molécula secretada, su rango de acción se extiende a una región más amplia que la indicada por su propia fuente de producción. Como parte del proceso de especificación del prosencéfalo, la placa alar del prosencéfalo secundario comienza eventualmente a expresar Shh a nivel del tallo telencefálico, pero más tardíamente que la placa basal. Es relevante conocer la localización precisa de los sitios de producción, debido a las consecuencias que podría tener sobre la especificación de las identidades regionales de cada uno de los campos paliales y subpaliales que comienzan a experimentar la acción directa o indirecta de esta molécula. Con esta finalidad se analizó la expresión de Shh mediante hibridación in situ con ribosondas en embriones de pollo desde HH8 hasta estados postnatales tempranos. A partir de HH17 se detecta expresión ventricular de Shh en la placa alar en una posición dorsal al receso óptico, que corresponde a la región preóptica (POA). En estadios más avanzados (a partir de HH22-23) la expresión se extiende al manto de dominios más dorsales, como el pálido y el estriado. La distribución temporo-espacial indica una fuente de Shh alar inicialmente localizada en el POA, que luego se extiende a otras regiones subpaliales (palido y estriado), posiblemente debido a una migración tangencial desde el POA.

Control of cell invagination by coordinated control of GAP and GEF Rho GTPase regulators

Castelli-Gair Hombría, J.[1], Simoes, S.[2], Jacinto, A.[2], Denholm, B.[3], and Sotillos, S.[1]

[1]CABD, (CSIC/UPO) Sevilla.
[2]Instituto de Medicina Molecular, Lisboa.
[3]Department of Zoology, University of Cambridge.

During development, local activation of signalling pathways and transcription factors control the particular cell behaviours that result in morphogenesis. By concentrating on the development of the *Drosophila* posterior spiracles, we have uncovered a genetic cascade that modulates cell shape. The posterior spicle's spiracular chamber develops by a two-stage process beginning with the localised invagination of 80-100 ectodermal cells followed by an elongation stage in which the cells increase their length fourfold. We have found that spiracle cell invagination requires cytoskeleton regulation by the small RhoGTPase. Using a new tool that allows us to detect activated Rho we found that this GTPase is activated on the apical side of the cell. Apical activation of Rho in the posterior spiracles depends on two factors: (1) The localised activation Rho activators and repressors to the spiracle primordium by the Abd-B cascade; and (2) the opposing intracellular localisation of these regulators to opposite membrane domains. We show results indicating that the GEF proteins have to localise apically in the spiracle cells, and the GAP proteins dorso laterally.

Arterias y venas coronarias tienen un diferente origen embrionario

Portillo, V., Guadix, J.A., Clemente, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., y Pérez-Pomares, J.M.

Dpto. de Biología Animal. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n 29071 Málaga.

El sistema vascular coronario es el conjunto de vasos que irriga el músculo cardiaco. Se trata de una red vascular compleja que se desarrolla de forma relativamente tardía en el embrión de los vertebrados y que consta de una porción venosa y de otra arterial. Durante los primeros estadios de la morfogénesis coronaria arterias y venas sólo pueden distinguirse por sus conexiones anatómicas, ya que los esbozos de las venas coronarias conectan con el seno venoso (polo venoso del corazón) y mientras que los de las arterias coronarias lo hacen con la base de la arteria aorta (polo arterial). Resultados no publicados de nuestro grupo de investigación sugieren que las venas coronarias se desarrollan, desde un principio, en conexión con el flujo sistémico, lo que contrasta con el hecho conocido de que las arterias coronarias se formen en el embrión aisladas de la circulación. Estos dos hechos podrían interpretarse como la evidencia de un origen diferencial para arterias y venas coronarias. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis hemos diseñado un estudio que incluye el uso de técnicas de microinyección, elaboración de quimeras pollo-codorniz, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Nuestros resultados indican: 1) que las venas coronarias se desarrollan a través de un mecanismo de angiogénesis a partir del endocardio del seno venoso (y por lo tanto están siempre en contacto con el flujo sanguíneo) y 2) que las arterias coronarias son básicamente un derivado epicárdico que se desarrolla mediante un proceso de vasculogénesis.

Nuevos potenciales de diferenciación de los progenitores celulares del epicardio y del sistema vascular coronario

Ruíz-Moreno, A., González-Rosa, J.M., Guadix, J.A., Portillo, V., Muñoz-Chápuli, R., y Pérez-Pomares, J.M.

Dpto. de Biología Animal. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n 29071 Málaga.

El epicardio es la capa de tejido más externa del corazón. Su origen es el proepicardio, una masa de células de origen celómico originalmente situada entre el primordio hepático y el polo venoso del tubo cardiaco primitivo. El principal derivado del proepicardio es el epicardio, una capa epitelial monoestratificada que se adhiere y extiende sobre el miocardio recubriéndolo completamente. A lo largo del desarrollo embrionario el epicardio sufre una transición epitelio-mesénquima que da lugar a una población de células mesenquimáticas invasivas que recibe el nombre genérico de Células Derivadas de Epicardio (CDE). Aunque se sabe que los principales derivados de las CDE son los vasos coronarios y el tejido fibroso intersticial, hasta la fecha no se ha puesto a prueba la capacidad de estas células para diferenciarse en otros tejidos presentes en el corazón. Con el objeto de estudiar el potencial de estas células hemos diseñado un estudio *in vivo* e *in vitro* en el que se usan técnicas de cultivo en suspensión y en condiciones de alta densidad, cocultivos, elaboración de quimeras pollo-codorniz así como métodos inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*. Los resultados obtenidos aportan evidencias en favor de la capacidad del tejido proepicárdico para diferenciarse en cartílago y precursores sanguíneos.

Cuantificación de ARNm y expresión proteica de las subunidades β de canales de potasio Kcne1-Kcne5 durante la cardiogénesis

De Castro, M.P., Aránega, A., y Franco, D.

Grupo Desarrollo Cardiovascular. Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén.

Los canales de potasio son esenciales en el corazón ya que intervienen en la repolarización del potencial de acción cardíaco. Las subunidades Kcne, (Kcne1-Kcne5), pertenecen a una importante familia de péptidos transmembrana que modulan la función de varias subunidades α-formadoras de poro. En la actualidad, se conoce relativamente poco sobre cuáles son sus niveles de expresión a nivel de ARNm, asi como sobre su patrón de expresión proteico durante la cardiogénesis. Nosotros hemos estudiado los niveles de expresión de estas subunidades durante el desarrollo cardiaco atrial y ventricular en el ratón mediante RT-PCR en tiempo real. Nuestros resultados muestran que la subunidad Kcne1 presenta su máxima expresión en el miocardio atrial adulto, mientras que la subunidad Kcne2 muestra su nivel de expresión mas elevado en periodo neonatal. Las subunidades Kcne3, 4 y 5 presentan un patrón común en el miocardio atrial, observandose un pico de expresión máxima en el estadio E17. Por otro lado, en el miocardio ventricular, las subunidades, Kcne1, 4, y 5 presentan unos niveles de expresión muy similares, observandóse la máxima expresión en el estadio neonatal. Kcne2, está prácticamente ausente a lo largo del desarrollo embrionario, observándose la máxima expresión en el adulto mientras Kcne3 alcanzan su máximo nivel en el estadio E12. El patrón de expresión de Kcne1, Kcne2 y Kcne3 a nivel proteico está en concordancia con los datos de qRT-PCR. Estos datos parecen indicar que estas subunidades β tienen un comportamiento diferencial entre el miocadio atrial y ventricular durante el desarrollo, pudiendo actuar de forma coordinada para modular la función de las diferentes subunidades formadoras de poro.

Análisis de los genes realizadores del gen Hox *Abd-B*

Rivas Peña, M.L., y Castelli-Gair Hombría, J.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, España.

Los genes Hox codifican factores de transcripción que dirigen la formación de estructuras específicas de segmento en los dominios donde se expresan. Estos genes funcionan activando a otros llamados "realizadores" que codifican proteínas que modulan los procesos celulares durante la morfogénesis. Los genes "target" de los genes Hox suelen ser otros factores de transcripción y moléculas de señalización que activan a los genes realizadores. *Abd-B* es el gen Hox que se expresa en el dominio más posterior de *Drosophila*, dirigiendo la formación de estructuras en los segmentos abdominales A8-A10, entre otras los espiráculos posteriores. Abd-B es necesario y suficiente para la formación de esta estructura. Se han identificado factores de transcripción target de Abd-B como *cut, empty spiracles* y *spalt*, implicados en la morfogénesis de espiráculos. Otro target de Abd-B es la ruta JAK/STAT. Mutaciones en cualquiera de los componentes de la ruta dan como resultado espiráculos anormales. Aquí analizamos si estos cuatro target primarios de Abd-B son capaces de dirigir la formación de espiráculos. Utilizando el sistema UAS/GAL4 para co-expresar ectópicamente los cuatro target primarios de Abd-B en segmentos anteriores al A8, se genera expresión de los target secundarios en tales segmentos. Esta expresión queda confinada a regiones análogas a aquella que ocupan los espiráculos en el segmento A8, sugiriendo que tales regiones podrían corresponder a estructuras tipo espiráculos.

DESARROLLO
DEL SISTEMA NERVIOSO

Expresión de la subunidad β1 de integrinas en microglía ameboide cultivada in vitro sobre lámina basal de retina embrionaria

Tassi, M., Calvente, R., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A., Carrasco, M.C., Santos, A.M., y Navascués, J.

Dept. Biología Celular, Fac. Ciencias, Univ. Granada, Granada.

La subunidad β1 de integrinas forma parte de receptores de moléculas de matriz extracelular como la laminina. Las células microgliales ameboides que colonizan la retina embrionaria de codorniz mediante migración tangencial sobre los pies terminales de células de Müller (PTCM) no expresan in situ esta molécula de membrana pero sí lo hacen las células de Müller. En este estudio se cultivaron in vitro láminas de la parte vítrea de retina de embriones de codorniz que contenían la membrana limitante interna (lámina basal) tapizada por PTCM (láminas MLI/PTCM). Las células microgliales ameboides en proceso de migración tangencial sobre los PTCM permanecían adheridas sobre estas láminas, facilitando su aislamiento y posterior cultivo in vitro. A partir de 3 horas de cultivo, las células microgliales fagocitaban los PTCM localizados en sus inmediaciones, que eran puestos de manifiesto mediante inmunocitoquimica con el anticuerpo JG22, el cual reconoce la subunidad β1 de integrinas. A las 24 horas de cultivo, la superficie de las células microgliales, que hasta ese momento era JG22-negativa, se hacía JG22-positiva, demostrando la expresión de la subunidad β1 de integrinas. Coincidiendo con este hecho, las células microgliales incrementaban su superficie de adhesión al sustrato y su morfología llegaba a ser más aplanada. (Financiado por el Proyecto BFU2004-01209 del MEC).

Expresión de *Dach2* durante el desarrollo del telencéfalo de pollo

Sandoval-Tortosa, J.E., Ferrán, J.L., y Puelles, L.

Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

El gen *Dach2* (homólogo de *dachshund* en Drosophila) codifica un factor nuclear implicado en varias redes genéticas de desarrollo, responsables de la inducción miogénica y la determinación de la retina. En *Drosophila*, *dachshund* se expresa en el cerebro, cordón nervioso ventral y en los discos imaginales del ojo, ala, antena y pata (Mardon et al, 1994). De forma similar, *Dach1* se expresa en el cerebro embrionario, vesículas ótica y óptica, y esbozos de miembros de ratón (Davis RJ et al, 1999). Ello sugiere que los factores que controlan la expresión de *dachshund* y *Dach1* varían poco durante la evolución. Existe una descripción parcial de *Dach2* en el telencéfalo de pollo (Szele y Cepko, 2002) que motivó nuestro estudio en profundidad. Hemos estudiado el patrón de expresión de *Dach2* por hibridación *in situ* en el telencéfalo de pollo, desde HH19 (E3) hasta estadios postnatales. Basando nuestra descripción en el modelo palial prosomérico (Puelles et al., 2000; Puelles y Rubenstein 2003), confirmamos la expresión ya descrita en la zona ventricular del subpalio y en el palio ventral (aunque no en su estrato superficial y su parte amigdalina), y comunicamos áreas de expresión adicionales, de aparición más tardía, en el núcleo intersticial del hiperpalio accesorio, la región corticoide caudodorsolateral y otras zonas telencefálicas. Este patrón sugiere un posible papel funcional de *Dach2* en la regionalización palial, donde podría actuar como cofactor transcripcional (Heanue et al, 1999)

Apoyado por el proyecto MEC BFU2005-09378-C02-01.

El hipotálamo de pollo y sus subdivisiones dorsoventrales y rostrocaudales durante el desarrollo

Bardet, S.M., y Puelles, L.

Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

Hemos estudiado – con la ayuda de técnicas de hibridación in situ de RNA y de inmunohistoquímica – la regionalización del hipotálamo de pollo durante el desarrollo embrionario. Para ello hemos analizado diferentes familias de genes apoyándonos en el modelo prosomerico (Puelles y Rubenstein, 2003). Este modelo sitúa el hipotálamo rostralmente al prosomero p3 (pretálamo) y ventralmente a la vesícula telencefálica (limitando con el subpalio, con expression de Dlx5). La particularidad del desarrollo del hipotálamo reside en su posición suprayacente a la placa precordal, la cual es capaz de influir diversamente sobre el desarrollo de estructuras tales como la hipófisis, la eminencia media y la región mamilar. El desarrollo del hipotálamo es aun bastante desconocido debido a su complejidad regional y la gran heterogeneidad y falta de sistematización de sus tipos neuronales. En nuestro trabajo, dividimos el hipotálamo en diferentes regiones histogenéticas según los ejes dorsoventral y anteroposterior. Comparamos entre otros la expresión de marcadores conocidos, como la familia Dlx, Nkx2.2 y Otp, para subdividir la placa alar del hipotálamo, o Nkx2.1 y Shh para la placa basal. Ofrecemos una compartimentación mas precisa del hipotálamo y un nuevo modelo de regionalización consistente con el esquema prosomérico, coherente con diversas posibilidades de interpretación del patterning local.

Proyecto MEC BFU2005-09378-C02-01; S.B. es becaria predoctoral del MEC.

Delección de Sonic hedgehog por la endonucleasa Cre bajo el promotor de Engrailed1

Pérez-Balaguer, A., Puelles, E., y Martínez, S.

Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH-CSIC. Carretera de Valencias (N-332). Campus de San Juan. Alicante 03550.

En el presente trabajo hemos realizado el análisis fenotípico de un mutante condicional para Shh bajo el promotor de Engrailed 1 ($En1^{cre/+}$;$Shh^{flox/flox}$). En este modelo animal perdemos la expresión del gen Shh en el dominio de expresión de En1, en la placa del suelo y placa basal del mesencéfalo caudal y del rombencéfalo rostral, es decir, a ambos lados del istmo. Esto nos permitió analizar en detalle el papel de Shh en el establecimiento de la región basal de este territorio así como en la diferenciación de sus diferentes núcleos. Hemos detectado que dicho mutante presenta una importante pérdida de tejido neural en la placa basal del territorio afectado. Con diversos marcadores hemos podido observar que tanto el núcleo oculomotor (mesencéfalo) como el troclear (istmo) están ausentes(Islet1). También el área tegmental ventral y la sustancia negra se encuentran ampliamente reducidas (TH, territorio dopaminérgico) y en el rombencéfalo rostral detectamos una reducción en los núcleos del rafe (5-HT, área serotoninérgica). Con este estudio queda probado el papel esencial que juega Shh, no sólo en la inducción del dominio basal del tubo neural, sino en la diferenciación y mantenimiento de dicha región.

Trabajo financiado por la Generalitat Valenciana GV05/080, MEC BFU2005-09085, FIS PI050962, y programa Ramón y Cajal a E.P.

Especificación de oligodendrocitos en el encéfalo de aves

García-López, R., y Martínez, S.

Instituto de Neurociencias de Alicante. UMH-CSIC. Ctra. Nacional de Valencia, km 87. 03550. Campus de San Juan. San Juan de Alicante.

Los oligodendrocitos son las células que forman la mielina en el sistema nervioso central de vertebrados. En el cerebro, los precursores oligodendrogliales surgen de diferentes regiones, distribuidas a lo largo del eje caudorostral del neuroepitelio ventricular. En el prosencéfalo rostral de aves, los oligodendrocitos emergen de territorios alares y migran tangencialmente hasta invadir todo el telencéfalo (Olivier y col., 2001), mientras que en el prosómero 1 del diencéfalo y el mesencéfalo, los oligodendrocitos tienen un origen basoventral. Para investigar los territorios colonizados por las células progenitoras oligodendrogliales que se originan del diencéfalo y mesencéfalo, hemos realizado una serie de quimeras pollo/codorniz. Transplantes homotópicos demuestran claramente que, durante el desarrollo embrionario del sistema nerviosos central, los progenitores oligodendrogliales que emergen del prosómero 1 y el mesencéfalo migran tangencialmente hasta invadir las regiones dorsales de los prosómeros 1-3, mesencéfalo y cerebelo.

Expresión del gen *FGF19* en el desarrollo del sistema nervioso central del pollo

Gimeno, L., y Martínez, S.

Instituto de Neurociencias de Alicante. UMH-CSIC. Ctra. Nacional de Valencia, km 87. 03550. Campus de San Juan. San Juan de Alicante.

Los Factores de Crecimiento Fibroblásticos (FGF) son proteínas de secreción que juegan papeles esenciales durante el desarrollo, mediando la regulación de la proliferación, migración, supervivencia y especificación celular. *Fgf15* es un miembro de la familia presente en ratón y ampliamente expresado en estadios tempranos del desarrollo y fuertemente relacionado con la actividad de los Organizadores Secundarios de cerebro. *Fgf19* es el ortólogo del gen *Fgf15* en pollo y humano, y su patrón de expresión ha sido menos estudiado. El presente trabajo muestra el patrón de expresión detallado del gen *Fgf19* a lo largo del desarrollo del tubo neural del pollo, en comparación con su ortólogo *Fgf15* de ratón. *Fgf19* presenta una expresión dinámica y muy distinta a la de su ortólogo a lo largo del desarrollo cerebral. A pesar de sus diferencias en patrón de expresión y su baja homología de secuencia, ambos genes presentan la misma estructura genómica y misma organización cromosómica. Además, hemos observado que ambos genes son inducidos por Fgf8 alrededor del Istmo y por Shh en regiones más rostrales del neuroepitelio, sugiriendo la conservación de elementos reguladores y apoyando la ortología de ambos genes.

FGF8 controla el desarrollo normal del diencéfalo de mamíferos

Martínez, A., y Martínez, S.

Laboratorio de Embriología Experimental, Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH-CSIC, Ctra. de Valencia (N-332), 03550 Alicante.

El conocimiento del desarrollo del sistema nervioso central ha avanzado enormemente en los últimos años. Sin embargo existen regiones bastante desconocidas por su complejidad morfogenética y estructural, como el diencéfalo. Aunque se conocen muchos genes cuya expresión parece importante para el desarrollo del diencéfalo, todavía existen numerosas lagunas acerca de las interacciones génicas que lo controlan. Fgf8 es miembro de una familia de moléculas de señalización que se ligan a receptores tirosina-kinasa en las células diana, activando una cascada de señalización implicada en el crecimiento y desarrollo celular. Fgf8 exhibe un patrón de expresión restringido espacial y temporalmente durante el desarrollo del SNC, y se ha demostrado su papel en procesos básicos del desarrollo de áreas donde se expresa, como el istmo y el telencéfalo. Sin embargo no se ha analizado el papel de Fgf8 en el diencéfalo, donde también aparece expresado en el epitelio dorsal de la placa alar. Con la finalidad de esclarecer el papel de esta molécula en el desarrollo diencefálco, se ha estudiado el fenotipo de ratones hipomorfos para Fgf8. Este análisis ha revelado defectos severos en las regiones diencefálicas en las que Fgf8 se expresa, así como limítrofes. Alterándose el desarrollo de estructuras nucleares, como el epitálamo y el pretálamo (tálamo ventral y eminencia talámica).

Análisis de la falta de función de los genes Iroquois (*Irx*) durante el desarrollo del sistema nervioso en Xenopus

Rodríguez-Seguel, E., Alarcón, P., Fernández, A., y Gómez-Skármeta, J.L.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), CSIC/Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.

Los genes Iroquois (*Irx*) participan en numerosos eventos durante el desarrollo. En vertebrados, los genes *Irx* están agrupados en dos complejos génicos, *IrxA* e *IrxB*, donde cada complejo contiene tres genes cada uno. Estudios previos indican que estos genes se requieren para la subdivisión del neuroectodermo en los ejes antero-posterior y dorso-ventral. Para estudiar la función de estos genes, se han llevado acabo numerosos estudios de ganancia de función, usando formas silvestres o dominantes negativos. Sin embargo, hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio exhaustivo de falta de función. En nuestro laboratorio hemos realizado dicho análisis utilizando morfolinos específicos para cada uno de los genes *Irx* de *Xenopus.* Esto nos ha permitido estudiar el efecto de la falta de función de genes *Irx* individuales o combinaciones de estos. Nuestros estudios han permitido demostrar que los genes *Irx* son necesarios para la correcta subdivisión del sistema nervioso. Además, hemos comprobado que algunos de estos genes son redundantes.

Mapa prospectivo del prosencéfalo en estadio de placa neural de pollo

Sánchez-Arrones, L.[1], Ferrán, J.L.[1], Rodríguez-Gallardo, L.[2], y Puelles, L.[1]

[1]Dpto. Anatomía Humana y Psicobiología. Facultad de Medicina.Universidad de Murcia.
[2]Dpto. Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal. Universidad de Extremadura. Badajoz.

Los mapas de destino establecen la posición relativa y tamaño de grupos celulares que darán lugar a ciertos derivados, identificados experimentalmente. Estudios previos han establecido distintos mapas del territorio neural en embriones de pollo (Rodríguez-Gallardo et al. 2005), pero abundan las discrepancias acerca de los límites exactos de la placa neural. En este sentido, el mapa de placa neural de pollo en HH3d-4 de Fernández-Garre et al. (2002), aportó una base más sólida. Estos datos complementan el mapa prospectivo en estadio 8, próximo al cierre del tubo neural, Cobos et al. (2001). A efectos de casar ambos mapas, hemos realizado un estudio preliminar de los movimientos morfogenéticos del prospectivo prosencefalo desde HH4 hasta HH8, considerando principalmente las subdivisiones rostrocaudales y ciertos territorios de expresión génica. A tal efecto, realizamos transplantes de placa neural marcados fluorescentemente en HH4, analizando resultados en HH8. Estos datos se comparan con mapas de especificación molecular en HH4 y HH8. Aquí estudiamos el patrón de expresión de genes pan-neurales (Sox2 y Sox3); genes de expresión en borde y territorios laterales de la placa neural (Dlx3 y Dlx5); genes de regionalización dorsoventral (Ganf,Shh) o anteroposterior (Otx2;Six3,En1,Fgf8). En estadios tempranos del desarrollo la mayoría de estos patrones están solapados en las distintas subdivisiones prospectivas de la placa neural, pero ya comienzan a aparecer algunos campos de especificación combinatoria.

Subvencionado por proyectos MEC BFI 2002-3886 y BFU2005-09378-C02-01 (L.P; L.S.A. es becaria de FPI en este proyecto; J.L.F es becario postdoctoral de Fundación Carolina) y 2PR03A004 (L.R.G.).

Estudio experimental de los territorios presuntivos y la migración tangencial palio-subpalial de neuronas en el telencéfalo del embrión de pollo

Pombero, A., y Martínez, S.

Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH-CSIC, Universidad Miguel Hernandez, Campus de San Juan, N-332, Km 87, 03550 San Juan de Alicante, España.

Diversos estudios basados en análisis comparativo de la expresión de genes han establecido la homología del telencéfalo en vertebrados (Puelles, 2000). Sin embargo, se necesita un estudio prospectivo que demuestre experimentalmente las relaciones anatómicas en el territorio presuntivo del telencéfalo (*fate map)* para comprender los cambios morfogenéticos de su desarrollo. Estudios previos de *fate map* han sido realizados en estadio de placa neural (Cobos, 2001) o no muestran suficiente información anatómica (Smith-Fernandez, 1998). Hemos realizado un *fate map* del telencéfalo en el tubo neural del embrión de pollo y de las migraciones celulares telencefálicas durante el desarrollo embrionario, usando la técnica de trasplantes codorniz-pollo. Los trasplantes rostro-mediales originaron el subpalio. La región media y dorsal formó estructuras paliales como el palio lateral y el palio dorsal y caudal a ellas, el territorio presuntivo del palio medial y la fimbria del hipocampo. Los trasplantes postero-laterales muestran territorios positivos en la amígdala. Caudal al palio medial y al subpalio encontramos el territorio presuntivo de pretálamo, en el límite caudal del telencefalo. El estudio de los trasplantes de la región más lateral y ventral de la vesícula telencefálica, reveló los primordios del área entopeduncular, el área preóptica y la retina, formando dominios longitudinales. Estudiamos también las migraciones celulares tangenciales dorso-ventrales que se producían desde el bulbo olfatorio hacia el tubérculo olfatorio y el área preóptica, y desde el septum hacia el área preóptica. Estas migraciones comienzan en el estadío HH24 y observamos que la mayoría de las células migradas son positivas para MAP-2 y Reelina.

Microarchitectural changes during development of the cerebellar cortex

Mecha, M., Peña-Melián, A., Rabadán, M.A., Torres, J., Valero, M., and Blanco, M.J.

Dpto. Anatomía y Embriología Humana I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Avda. Complutense s/n. 28400 Madrid.

The morphogenesis of the cerebellar cortex requires coordinated cell proliferation, migration and differentiation in highly organized temporal and spatial patterns to form its characteristic layered architecture. Cortical histogenesis reveals that the external granular layer (EGL) is the outermost, germinative, transitory layer in the vertebrate embryo, whose formation depends of both proliferation and migration of granular neuroblast cells. Regulation of these events in terms of time and intensity results in a transient increase of the EGL thickness that in the chick was accompanied by a striking indentation pattern in the EGL, dividing it in longitudinal bands along the folia (Feirabend, 1990). Our preliminary data indicate the presence of indentations in a restricted temporal pattern in two avian species. The aim of this work was to study the timing and cytoarchitectonic characteristics of the EGL's indentations since this pattern might reflect the cellular internal dynamic of this layer and cellular relationships between the granular and adjacent meningeal and Purkinje neuroblast cell populations, both related to the stabilization and mitotic activity of the EGL. Considering the essential role of EGL for cerebellar shaping and cortical laminar organization and attending the structural organization of the cerebellum in longitudinal compartments, we propose indentations as morphological features that reflect an expansive cerebellar intrinsic mechanisms of development.

Estudio de las conexiones habenulares durante el desarrollo de la lamprea de mar

Rodríguez-Alonso, M., y Pombal, M.A.

Grupo Neurolam. Dpto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. 36.310-Vigo.

La lamprea de mar muestra un ciclo de vida complejo. Tras la eclosión empieza el periodo larvario, el cuál es básicamente sendentario y la alimentación es por filtración. Al final del periodo larvario se produce una metamorfosis tras la cuál, abandonan el río para convertirse en grandes nadadoras y parasitas de peces de mayor tamaño. Durante la metamorfosis se produce un importante desarrollo de su encéfalo. Las habénulas se localizan en el techo diencefálico de p2 y son estructuras prominentes y altamente asimétricas en la lamprea de mar. En todos los vertebrados constituyen un sistema de proyección altamente conservado que conecta el prosencéfalo límbico y el rombencéfalo. En mamíferos han sido implicadas en diferentes funciones como olfacción, apareamiento y alimentación, entre otras. Nuestra hipótesis de partida fue que el cambio en la forma de vida de la lamprea, antes y después de la metamorfosis, se ve reflejada en la organización encefálica, incluyendo las conexiones habenulares. Después de realizar marcajes con BDA en las habénulas de larvas y ejemplares adultos, los resultados obtenidos muestran que no existen grandes diferencias en la organización de sus conexiones habenulares. Por otro lado, las conexiones encontradas en larvas muestran que las aferencias habenulares son más complejas que las previamente descritas. Además, se ha comprobado el alto grado de similitud con las conexiones encontradas en otros vertebrados.

Areas de proliferación y desarrollo postnatal en el telencéfalo de lagarto

Darias Perez, E.[1], Damas Hernández, C.[2], Delgado Fumero, A.[1], Alonso Fuentes, A.[1], y Trujillo Trujillo, C.M.[1]

[1]Unidad de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife.
[2]Area de Psicobiología, facultad de Psicología, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife.

En reptiles, la mayoría de las regiones telencefálicas completan su desarrollo en el periodo postnatal. También la actividad mitótica en las distintas áreas ventriculares persiste durante este periodo. Los estudios en cerebros adultos, empleando marcadores moleculares de proliferación celular como BrdU y PCNA, demuestran que la capacidad proliferativa persiste en todas las áreas ventriculatres del telencéfalo, si bien con diferencias cuantitativas entre unas y otras. Se ha demostrado además, que un gran número de las células producidas en la etapa adulta se diferencian en neuronas y se cree que las células que las originan son células de glia radial. Con el fin de comprobar la extensión de la actividad proliferativa en el telencéfalo postnatal y ver su relación con el desarrollo de distintas agrupaciones celulares, inyectamos BrdU en lagartos con pocos días de eclosión y los sacrificamos secuenciadamente entre 1 y 16 días después. Los resultados preliminares indican que: 1) Todas las áreas ventriculares presentan células BrdU+, pero con importantes diferencias entre ellas. 2) La cantidad de células BrdU+ es mayor que en el adulto. 3) La tasa de migración de las células generadas es sorprendentemente baja. Es posible que esto se deba a las condiciones de cautividad pero en cualquier caso, parece indicar que la migración de estas células necesita de señales externas a ellas mismas, no siempre disponibles.

SEÑALIZACIÓN

Regulación del receptor de ecdisona tipo A mediante ubiquitinación por la E3 Ariadne durante la metamorfosis de *Drosophila*

Gradilla Castellanos, A.C., y Ferrús, A.

Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid (España).

La hormona esteroidea Ecdisona regula la metamorfosis de *Drosophila*, tanto su inicio como el seguimiento de cada una de sus etapas. Esta regulación implica la activación del Receptor de Ecdisona (EcR) quien inicia una cascada de actividad transcripcional. EcR es un receptor nuclear que, al igual que en vertebrados, se activa en forma de heterodímero con su cofactor Ultraspiracles. El gen EcR produce tres diferentes isoformas, EcR-A, EcR-B1 y EcRB2, las cuales parecen regular distintos aspectos del desarrollo. El Receptor de Ecdisona actúa como un factor de transcripción cuya estequiometría es crucial; ya que tanto la reducción como el incremento en los niveles de cualquiera de las isoformas causan letalidad. La ubiquitinación es un proceso de señalización de proteínas para su degradación en el proteosoma 26S y por tanto, tiene una función primordial en la regulación estequiométrica. El proceso de ubiquitinación se lleva a cabo por una serie de enzimas, E1, E2 y E3; y es en la E3 en la que recae la especificidad del proceso ya que es la que liga a la proteína sustrato. Ariadne-1a (Ari-1a) es una E3 cuya mutación, tanto de falta como de exceso de función, es letal durante la metamorfosis, presentando fenotipos característicos de un fallo en la vía de señalización de la Ecdisona. Además, mutantes para Ari-1a interaccionan genéticamente con mutantes de esta vía, principalmente en el caso de la isoforma EcRA. Hemos demostrado que Ari-1a interacciona directamente con EcR-A y que esta interacción regula su estequiometria, ya que al reducir los niveles de Ari-1a se incrementan los del receptor y al aumentar Ari-1a decrecen. Esta regulación es específica de isoforma, ya que no ocurre con la isoforma B1 y tiene lugar mediante ubiquitinación. Finalmente, esta función reguladora de Ari-1a tiene consecuencias a nivel transcripcional, llegando a afectar la estructura cromatínica.

Financiación recibida: BMC2003/05051

The PDZ protein Canoe/AF-6 links Ras-MAPK, Wingless/Wnt and Notch signaling pathways by binding Ras, Notch and Dishevelled

Speicher, S.[1], Baylies, M.[2], and Carmena, A.[2,1]

[1]Present address: Instituto de Neurociencias de Alicante CSIC/UMH. Unidad de Neurobiología del Desarrollo. 03550 Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain.
[2]Program in Developmental Biology. Sloan-Kettering Institute (MSKCC), 1275 York Avenue. New York, NY-10021.

Canoe (Cno)/AF-6 is a cytoplasmic protein normally associated to cellular junctions. Cno/AF-6 comprises two Ras-associating domains, through which Cno/AF-6 binds the activated form of Ras (Ras^{Act}), one Kinesin-like and one Myosin-V-like domains, present in proteins that interact with cytoskeleton components, and one PDZ (PSD-95, Dlg, ZO-1) motif, found in many scaffolding proteins. We have analyzed the function of Cno during *Drosophila* muscle/heart progenitor specification. This process requires the coordinated action of multiple signaling pathways, such as Wingless (Wg)/Wnt, Ras-MAPK and Notch (N). We show that Cno links and modulates these three signaling pathways throughout progenitor specification. Cno was expressed in the mesoderm at the moment progenitors are being specified. Genetic interactions between *cno* and components of Wg, Ras and N pathways suggested that Cno inhibits all these signals. Indeed, *cno* loss-of-function phenotype resembled that observed in embryos in which Wg, Ras^{Act} and N^{Act} are overexpressed simultaneously in the mesoderm. Yeast two-hybrid and co-IP assays, in vivo and in vitro, showed that Cno physically interacts with N and Dishevelled (Dsh), a key effector of Wg/Wnt pathway. In addition, Cno gain-of-funtion altered N and Dsh subcellular localization. We propose a working model in which Cno, by binding Ras^{Act}, Dsh and N, represses the signals that these proteins trigger and actively coordinates, at the membrane level, Ras-MAPK, N and Wg-Dsh cross-talk throughout progenitor specification.

La familia de genes Wnt no canónica y los genes homeobox T-box, están involucrados en la diferenciación del tracto digestivo en el pez cebra

Rojo Salvador, C., y González Martínez, E.

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, U.C.M. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid.

En el pez cebra, los precursores endodérmicos forman, durante gastrulación, una capa de células aplanadas que se extiende sobre el vitelo. Hacia las 26 horas post-fecundación (hpf) estos precursores han formado ya un cordón endodérmico en la línea media, adoptando una configuración bilaminar. Pocas horas después se establece la polaridad basal-apical en respuesta a señales de la matriz extracelular y se forma la luz intestinal. A partir de 120 hpf el epitelio intestinal es funcional y comienza la alimentación exógena. Los fenómenos de polarización y maduración celular en el pez cebra están controlados por la familia de genes Wnt no canónica, implicada en el control de movimientos celulares, así como por el gen *Knypek* (*kny*), un proteoglicano heparán sulfato relacionado con esta familia. Por otro lado, los genes homeobox *no tail* (*ntl*) y *spadetail* (*spt*) están relacionados con especificación celular en el mesodermo y puede que en el endodermo, y están involucrados en el control de movimientos celulares Recientemente hemos comprobado mediante microscopía electrónica de transmisión que en los mutantes *kny*, el epitelio del intestino de los alevines de 96 hpf mostraba defectos importantes de diferenciación, con ausencia de maduración y polarización adecuadas y falta de especialización celular, con ausencia de células enteroendocrinas y globosas en todo el intestino. Finalmente estos individuos morían justo al iniciarse la alimentación exógena. Con el fin de confirmar los hallazgos morfológicos, hemos analizado mediante inmunohistoquímica algunos aspectos de polarización y diferenciación celular en el intestino, no sólo de los mutantes *kny* sino de los dobles mutantes *kny/spt.* Nuestros primeros resultados apuntan que estos genes, que no influyen en la especificación del endodermo, sí son importantes para la correcta diferenciación del epitelio intestinal.

Hedgehog restricts its own expression domain in the Drosophila wing

Bejarano, F., Pérez, L., and Milán, M.

Icrea and Institut de Recerca Biomédica.

Stable subdivision of Drosophila limbs into Anterior (A) and Posterior (P) compartments is a consequence of asymmetric signaling by Hedgehog (Hh) from P to A cells. The activity of the homeodomain proteins Engrailed and Invected in P cells helps to generate this asymmetry by inducing expression of Hh in the P compartment and at the same time repressing the expression of the essential downstream component Cubitus interruptus (Ci). Thus, only A cells that receive the Hh signal across the compartment boundary will respond by stabilizing Ci. Here we describe a novel molecular mechanism that helps to maintain the Hh expressing and Hh responding cells in different non-overlappìng cell populations. master of thickveins (mtv), a target of Hh activity encoding for a nuclear Zinc Finger protein, is required to repress hh expression in A cells. Mtv exerts this action by binding to Groucho, the founding member of a superfamily of transcriptional corepressors that are conserved throughout eukaryotes. Thus, Hh restricts its own expression domain in the Drosophila wing through the activity of Mtv and Gro.

Cell cycle control during the transition from multipotency to differentiation in the Drosophila eye

Lopes, C.S.[1], and Casares, F.[1,2]

[1]Centro Andaluz de Biologia del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC, Seville, Spain.
[2]Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto, Portugal.

During the development of the *Drosophila* eye, fate specification and cell cycle are tightly regulated. These processes are associated to a moving signaling center, the morphogenetic furrow (MF), which sweeps the eye primordium in a posterior-to-anterior direction. Cells anterior to the furrow are undifferentiated and randomly proliferating, while cells immediately anterior and within the furrow withdraw synchronously from the cycle and arrest in a G1 state. Cell cycle withdrawal coincides with the expression of retinal differentiation markers within the eye disc. Posterior to the furrow, cells not recruited to the ommatidia precluster, committed as photoreceptors, undergo a synchronous round of division, the second mitotic wave (SMW), required to produce enough cells to complete ommatidial development. Current models suggest that the Wingless (Wg) pathway has a role in maintaining proliferation in the anterior undifferentiated domain of the eye primordium through the activity of its downstream target, Homothorax (Hth). Hth is a homeodomain transcription factor, expressed in most anterior domain of the eye disc. Hth plays two roles during eye development; acts as a repressor of early retinal genes and thus acts to prevent premature acquisition of a progenitor state and is required to maintain proliferation in early eye discs and in the anterior domain during third instar. The activity of Hth appears to be counteracted by the Dpp pathway. Expression of the TGF-ß molecule Dpp in the furrow induces and maintains the G1 arrest anterior to the furrow. While ectopic expression of Hth results in overgrowths and maintenance of asynchronous proliferation, loss of Dpp signaling derepresses Hth and cells fail to arrest in G1 anterior to the furrow. This suggests that these two pathways might exert an antagonistic role on cell cycle regulators essential for the maintenance of G1. Our study aims to address the mechanisms of cell cycle regulation mediated by Hth and the Dpp pathway, and how these mechanisms contribute to pathway integration required for proper eye development.

OTROS ASPECTOS DEL DESARROLLO

Regulación de las células madre de un melanoma humano en cultivos *in vitro* de embriones post-implantados de ratón

Azcoitia, I., Andollo, N., Eguizábal, C., Andrade, R., Arlucea, J., Boyano, M.D., y Aréchaga, J.

Laboratorio de Embriología Experimental y Molecular, Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, E-49940 Leioa, Vizcaya.

El fenotipo indiferenciado y la plasticidad como respuesta a señales inductoras son características que poseen en común las células madre embrionarias y las tumorales. Estudios cada vez más frecuentes ponen en evidencia dicho aserto y su regulación por factores y mecanismos, en gran medida, comunes. Se viene así a confirmar una de las interpretaciones más plausibles del cáncer, desde el punto de vista celular, como proliferación incontrolada de células madre, bien por alteraciones en su maduración o por efecto de los carcinógenos (las células madre tisulares, únicas con capacidad de división, serían sus dianas), no siendo por tanto las células malignas, según dicha interpretación, mas que una caricatura de las normales (Aréchaga, 1993). El motivo esencial de nuestro trabajo fue la investigación de la capacidad de regulación del micromedioambiente embrionario sobre las células del melanoma; un tumor altamente agresivo por su grado de indiferenciación y que se origina a partir de células madre procedentes de la cresta neural. Con estas miras, se han transplantado células de la línea A375 de melanoma humano, transfectadas con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), al saco vitelino de embriones de ratón al comienzo del período de gastrulación (7,5 dpc), los cuales han sido posteriormente cultivados *in vitro* mediante la técnica de New (1978). A continuación, mediante microscopía confocal, se investigó el comportamiento de las células tumorales en el cuerpo embrionario durante el proceso de organogénesis. Nuestros resultados han puesto en evidencia la ausencia de crecimiento tumoral en los embriones murinos transplantados y la recuperación de la capacidad migratoria de las células de melanoma humano, confirmándose de esta forma estudios recientes similares realizados con embriones de peces (Lee et al., 2005) y de aves (Kulesa et al., 2006), lo cual habla también en favor de la universalidad de los mecanismos implicados en la regulación tumoral.

Aréchaga, J. (1993). On the boundary between development and neoplasia. An interview with Barry Pierce. *Int. J. Dev. Biol.* **37**: 5-16.

Kulesa, P.M., Kasemeier-Kulesa, J.C., Teddy, J.M., y Margaryan, N.V., Seftro, E.A., Seftor, R.E.B., y Hendrix, M.J.C. (2006). Reprograming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 3752-3757.

Lee, L.M.J., Seftor, E.A., Bonde, G., Cornell, R.A., y Hendrix, M.J.C. (2005). The fate of human melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn*. **233**: 1560-1570.

New, D.A. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc*. **53**: 81-122.

Función de *hibris* en el establecimiento de la polaridad celular plana epitelial en *D. melanogaster*

Belacortu, Y., Muñoz-Descalzo, S., Durupt, F.C., Artero, R.D., y Paricio, N.

Departamento de Genética, Facultad CC Biológicas, Universidad de Valencia, E-46100 Burjassot.

En organismos pluricelulares los epitelios se polarizan no sólo en el eje apico-basal, sino también en el plano del epitelio. Esto se conoce como polaridad celular plana (PCP) epitelial. En el ojo de *Drosophila*, la PCP está reflejada por una distribución ordenada de los omatidios con respecto a una línea ecuatorial imaginaria (el ecuador). Además los omatidios aparecen en dos formas quirales o asimétricas, una en la parte dorsal del ojo y su imagen especular en la parte ventral. Este patrón se genera en el disco imaginal de ojo, cuando los precursores de los omatidios giran 90º hacia el ecuador. En el ojo, el establecimiento de la PCP está regulado por una ruta Fz no canónica, responsable de la quiralidad de los omatidios. Por otro lado, se ha demostrado recientemente que la ruta EGFR controla la rotación de los omatidios durante este proceso. Es importante recordar que la rotación de los omatidios implica la aparición de reorganizaciones del citoesqueleto, la modificación de las uniones que la célula establece con su entorno (matriz extracelular, otras células) y el establecimiento de nuevas uniones. *hibris* (*hbs*) es un gen de *D. melanogaster* que codifica una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, implicada en adhesión celular. Recientemente, se ha demostrado que *hbs* tiene un papel durante la morfogénesis del ojo, ya que está implicado en la organización de las células interomatidiales, por un mecanismo de adhesión diferencial de las células precursoras con las de su alrededor. En nuestro laboratorio hemos encontrado que los mutantes de falta y ganancia de función de *hbs* presentan además defectos de PCP en ojo. En este contexto, hemos analizado su posible papel en este proceso, así como el de otras proteínas de su misma familia.

Regulación del desarrollo dependiente de *FLO11* en levaduras

Barrales, R.R., Jiménez, J., e Ibeas, J.I.

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC. Carretera Utrera, Km1. 41013 Sevilla, Spain.

Los hongos pueden llevar a cabo cambios en su desarrollo en respuesta a alteraciones ambientales. Muchos hongos pasan de crecer en forma de levaduras a hacerlo con una morfología filamentosa, siendo este cambio esencial para la patogenicidad de alguno de ellos. *Saccharomyces cerevisiae* es uno de estos hongos que pueden pasar de crecer como células libres a una morfología similar a la de una hifa. Esta levadura también puede llevar a cabo un cambio en su desarrollo y pasar a formar estructuras multicelulares denominadas biofilm y donde las células se encuentran unidas unas a otras y a un sustrato. El gen clave para estos cambios en el desarrollo de *S. cerevisiae* es el gen *FLO11*. Este gen posee el promotor más grande identificado en el genoma de la levadura y su regulación es muy compleja. El uso de una cepa de *S. cerevisiae* con una alta expresión de *FLO11*, nos ha permitido buscar trans-activadores importantes para la expresión de dicho gen. Hemos encontrado factores de transcripción previamente descritos, lo que nos valida el sistema. Lo más destacable es la aparición mayoritaria de genes implicados en procesos de remodelamiento de cromatina. Mutantes para dichos genes tienen efectos muy drásticos en la caída de expresión de *FLO11*. Con estos datos podemos concluir que el remodelamiento de cromatina tiene un papel esencial en la activación de *FLO11*, el gen clave para los cambios en el desarrollo de *S. cerevisiae*.

Efectos de la radiofrecuencia (RF) sobre el tejido conjuntivo en el crecimiento de la cola de ratas Sprague-Dawley

Beltrán, E., Zuasti, A., Ferrer, C., Navarro, S.[1], Bernal-Mañas, C.M., Canteras, M., y Pastor, L.M.

Departamento de Biología Celular. Instituto de Envejecimiento. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. España.
[1]Grupo Tahe.

En los estudios sobre el efecto de la RF en el tejido conjuntivo, no se han evaluado histológicamente ni los cambios producidos en el mismo tras sucesivas aplicaciones de RF a baja potencia ni el efecto en su crecimiento. El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios que se producen principalmente en el fibroblasto, tanto en su proliferación como en su actividad biosintética. Se utilizaron 6 ratas tratadas y 6 control de 3 meses de edad en 3 grupos, sometidos a diferentes sesiones de RF (1,2 y 3). En todos ellos, se determinó el número de fibroblastos/área, los índices de proliferación y de expresión en Heat Shock Protein 47, realizándose los oportunos análisis estadísticos. Se observaron diferencias significativas entre los animales tratados y sus controles en todas las variables analizadas ($p<0.05$). En conclusión, la sucesiva aplicación de la RF a baja potencia supone una activación sostenida de los fibroblastos, con un aumento de su número, de su proliferación y de su actividad biosintética, sin que el incremento de temperatura cause ningún cambio histopatológico.

Financiado por el proyecto/contrato 8010. Universidad de Murcia/Grupo Tahe.

Papel de TGF-β1 y TGF-β3 en la muerte celular de la costura epitelial medial durante la fusión del paladar

Murillo, J., Del Río, A., Barrio, M.C., Garcillán, B., Amorós, M., Fuerte, T., Fernández, A., Martínez-Sanz, E., Maldonado, E., González, I., y Martínez-Álvarez, C.

Dpto. Anatomía y Embriología Humana I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. España.

La desaparición de la costura epitelial medial (CEM) es un evento importante durante la fusión del paladar y está producida, fundamentalmente, por muerte celular programada. TGF-β1 y TGF-β3 se expresan en la CEM y se han puesto en relación con este mecanismo, pero se desconoce cuál de los dos juega mayor papel en su génesis. El objetivo de nuestro estudio ha sido determinarlo. Utilizando ratones C57 silvestres y mutantes negativos para *tgf-β3*, hemos modificado la presencia de TGF-β1 ó TGF-β3 durante la fusión del paladar en cultivo y analizado, mediante TUNEL, morfometría e hibridación in situ, la presencia de muerte celular en la CEM y la expresión de *tgf-β1* y *tgf-β3*. Por otra parte, hemos investigado si, durante la formación/desaparición de la CEM, TGF-β1 y/o TGF-β3 se relaciona(n) con la muerte celular presente en la misma, realizando dobles marcajes anti-TGF-β1 ó TGF-β3 y TUNEL sobre secciones de gelatina de cabezas de embrión de ratón de 14,5 días. Nuestros resultados demuestran que tanto el exceso como el bloqueo de TGF-β1 inducen la sobrexpresión de TGF-β3, a la par que aumenta la muerte celular de la CEM. En ausencia de TGF-β3, TGF-β1 aumenta y la muerte celular de la CEM disminuye, aunque se incrementa de nuevo si se bloquea TGF-β1. En condiciones fisiológicas, las células de la CEM que mueren no poseen TGF-β3. Pensamos, por tanto, que TGF-β3 es el agente de muerte celular en la CEM y que TGF-β1 por sí solo no es inductor de muerte celular: la inducción de muerte celular observada al añadir TGF-β1 ocurre porque éste incrementa la expresión de TGF-β3. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, TGF-β1 debe controlar la expresión de TGF-β3 y, por tanto, la muerte celular de la CEM, porque en ausencia de TGF-β1 aumenta la expresión de TGF-β3. Concluimos, finalmente, que hay un fino equilibrio entre TGF-β1 y TGF-β3 en la producción de muerte celular de la CEM y que, si bien ambos son necesarios, es TGF-β3 su principal causante.

Este trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación de: la Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0539/2004), Fondo de Investigación Sanitaria (PI03/0185) y Universidad Complutense/Comunidad Autónoma de Madrid al grupo de investigación 920202.

Índice de autores

Abelló, G. 53
Aguilera, V. 24, 106
Alabadí, D. 21, 95
Alarcón, P. 47, 130
Alonso Fuentes, A. 135
Alonso, A. 54
Alonso, M.T. 66
Alonso-Cantabrana, H. 92
Alonso-Peral, M.M. 23, 97, 101
Alsina, B. 53
Álvarez, C. 45
Alvarez, Y. 66
Amaya, E. 64
Amorós, M. 151
Anami, S. 23
Andollo, N. 147
Andrade, R. 147
Andreu-Agulló, C. 35
Aránega, A. 109, 119
Aránega, A.E. 37
Aréchaga, J. 59, 147
Arlucea, J. 147
Artero, R. D. 148
Azcoitia, I. 147
Baleriola, J. 56
Bardet, S.M. 115, 125
Barrales, R.R. 149
Barrero, J.M. 24, 98
Barrio, M.C. 151
Bártulos Encinas, O. 113
Baylies, M. 140
Bejarano, F. 142
Belacortu, Y. 29, 148
Beltrán, E. 150
Beltrán, J.P. 20, 96
Benito-Gutiérrez, E. 32
Benlloch, R. 96
Berbel, A. 20
Bernal-Mañas, C.M. 150
Bertrand, E. 32
Bilioni, A. 63
Blanc, E. 77
Blanco, J. 38
Blanco, M.J. 133
Blázquez, M.A. 21, 95
Bovolenta, P. 51
Boya, P. 52
Boyano, M.D. 147
Buceta, J. 65
Caballero, T. 96

Callejo, A. 63
Calvente, R. 123
Calvo, V. 94
Campello, L. 104, 105
Candela, H. 101
Canela, O. 65
Canteras, M. 150
Cañamero, R.C. 93
Cañas, L.A. 96
Cañón, S. 30
Carbonell, J. 92
Carmena, A. 140
Carmona, R. 27, 117
Carrasco, M.C. 123
Casares, F. 143
Casero, P.J. 94
Casimiro, I. 94
Castelli-Gair Hombría, J. 116, 120
Castelli-Gair, J. 69
Castillo-Lluva, S. 78
Chakrabarti, N. 81
Chinchilla, A. 109
Clément, V. 39
Clemente, M. 117
Cnops, G. 23
Collignon, J. 48
Cortés-Eslava, J. 81
Crespo, M. 30
Cuadros, M.A. 123
D'Aniello, S. 32
Daga, R.R. 79
Damas Hernández, C. 135
Damas, C. 54
Darias Perez, E. 135
Davidson, E.H. 73
De Castro, M.P. 119
de la Rosa, E.J. 56
De Pablo Dávila, F. 113
Del Buono, J. 31
del Pozo, J.C. 98, 101
Del Río, A. 151
Delgado Fumero, A. 135
Delgado, A. 54
Delgado, F. 54
Deng, X.W. 95
Denholm, B. 116
de-Vega, S. 46
Domenech, M.J. 20
Domínguez-Frutos, E. 66
Dorey, K. 64
Durupt, F.C. 148

Eguizábal, C. 147
Espinosa, A. 95
Falcone, A. 23
Fariñas, I. 35
Fermin, Y. 51
Fernández, A. 47, 130, 151
Fernández-Nohales, P. 20
Ferrán, J.L. 115, 124, 131
Ferrández-Ayela, A. 97
Ferrándiz, C. 20
Ferrer, C. 150
Ferrón, S.R. 35
Ferrús, A. 139
Fidalgo, M.A. 80
Fleury, D. 23
Flores, J.M. 45
Flor-Parra, I. 78
Fogarty, D. 59
Franco, D. 37, 109, 119
Frigerio, M. 21
Fuerte, T. 151
Gallego-Bartolomé, J. 95
García-Alonso, L. 114
García-Bellido, A. 85
García-Cárcel, L. 21, 95
Garcia-Fernández, J. 32
García-López, R. 127
Garcia-Martinez, V. 67
Garcia-Masa, N. 67
Garcillán, B. 151
Gems, D. 77
Gibson-Brown, J. 31
Gimeno, L. 128
Giráldez, F. 53
Gómez-Skármeta, J.L. 47, 130
González Martínez, E. 141
González, I. 151
González-Bayón, R. 98, 104, 105
González-Reig, S. 91, 92
González-Rosa, J.M. 118
Gorfinkiel, N. 63
Graciá-Martínez, E. 103
Gradilla Castellanos, A.C. 139
Guadix, J.A. 27, 117, 118
Guerrero, I. 63
Guillo, A. 99
Hedden, P. 21
Hernández Sánchez, C. 113
Hernández-Torres, F. 37, 109
Herranz, C. 30
Herranz, H. 65

Herrera, P.L. 36
Hervás, J.P. 55
Hricová, A. 102, 103
Hurle, J.M. 38, 44
Ibañez, C. 63
Ibeas, J.I. 149
Irimia, M. 32
Jacinto, A. 116
Jiménez, J. 149
Jiménez-Delgado, S. 32
Jover-Gil, S. 24
Logan, M. 31
Lopes, C.S. 143
Lopez-Gracia, M.L. 67
Lopez-Sanchez, C. 67
Lozano, E. 37
Lozano, F.M. 100, 104
Lyons, G.E. 37
Macías, D. 27
Maconochie. M. 66
Madueño, F. 20, 96
Maeso, I. 32
Maldonado, E. 151
Mansilla Aparicio, A. 113
Manzanares, M. 30, 45
Marí-Beffa, M. 82
Marín-Teva, J.L. 123
Martí-Clúa, J. 55
Martínez, A. 129
Martínez, S. 126, 127, 128, 129, 132
Martínez-Álvarez, C. 151
Martínez-Fernández, S. 37
Martínez-Laborda, A. 91, 92
Martínez-Morales, J.R. 51
Martínez-Sanz, E. 151
Mas, C. 39
Más, P. 19
McElwee, J.J. 77
Mecha, M. 133
Medina, L. 115
Meilhac, S. 48
Micol, J.L. 23, 24, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106
Milán, M. 65, 142
Minguillon, C. 31
Mira, H. 35
Mollá-Morales, A. 99, 100
Monje, J.M. 80
Montero, J.A. 38, 44
Morcillo, J. 51
Muñoz, M.J. 80
Muñoz-Chápuli, R. 27, 117, 118

Muñoz-Descalzo, S. 29, 148
Murillo, J. 151
Nakamura, T. 46
Navarro, F. 37
Navarro, S. 150
Navascués, J. 123
Népote, V. 36
Nieto, M.A. 45
Ochando, I. 91
Orlando, L. 95
Paricio, N. 29, 148
Partridge, L. 77
Pascual-Anaya, J. 32
Pastor, L.M. 150
Peña-Melián, A. 133
Perales, M. 19
Perea Gomez, A. 48
Pérez, L. 142
Pérez-Amador, M.A. 92
Pérez-Balaguer, A. 126
Pérez-Gómez, J. 21
Pérez-Marcos 103
Pérez-Martín, J. 78
Pérez-Pomares, J.M. 27, 117, 118
Pernaute, B. 30
Petersen, L. 64
Phillips, A.L. 21
Piotrowska-Nitsche, K. 48
Piper, M. 77
Pombal, M.A. 134
Pombero, A. 132
Ponce, M.R. 23, 24, 97, 98, 99, 100, 101, 104, 105, 106
Portillo, V. 27, 117, 118
Puelles, E. 126
Puelles, L. 43, 54, 115, 124, 125, 131
Quesada, V. 102, 103, 105
Quijada, L. 63
Rabadán, M.A. 133
Reigada, R. 65
Ripoll, J.J. 91, 92
Risueño, M.C. 81
Rivas Peña, M.L. 120
Robles, P. 23, 24, 99, 105
Rochina, M.C. 96
Rodríguez-Alonso, M. 134
Rodríguez-Gallardo, L. 131
Rodriguez-Guzman, M. 44
Rodríguez-Huete, A. 81
Rodríguez-Seguel, E. 130
Rojo Salvador, C. 141
Ros, M. 67

Ros, M.A. 46
Rubio, N. 38
Rubio, V. 95
Ruiz i Altaba, A. 39
Ruíz-Moreno, A. 118
Sagués, F. 65
Sánchez, P. 39
Sánchez-Arrones, L. 115, 131
Sánchez-Gómez, P. 35
Sandoval-Tortosa, J.E. 124
Santa-Cruz, M.C. 55
Santos, A.M. 123
Schimmang, T. 66
Schuster, E. 77
Serna, L. 22, 93
Serrano, A. 20
Sierra, J. 63
Simoes, S. 116
Sivak, J. 64
Solano, R. 24
Sotillos, S. 69, 116
Sowden, J.C. 51
Speicher, S. 140
Stecca, B. 39
Steinberg, G. 78
Talamillo, A. 46
Tassi, M. 123
Technau, U. 28
Thornton, J.M. 77
Torre Perez, N. 38
Torres, J. 133
Torroja, C. 63
Trousse, F. 51
Trujillo Trujillo, C.M. 135
Trujillo, C.M. 54
Unda, F. 46
Valenciano González, A. 113
Valero, M. 133
Van Lijsebettens, M. 23
Velásquez, E.M. 114
Vendrell, V. 66
Vera, A. 91, 92
Yamada, Y. 46
Zbinden, M. 39
Zelarayan, L.C. 66
Zernicka-Goetz, M. 48
Zuasti, A. 150