



## Tesis

El papel de la Cinasa de Adhesión Focal en la muerte  
del tejido interdigital de la extremidad embrionaria  
del ratón

Que para obtener el título de  
Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Silvina Romero Suárez

Bajo la dirección del Dr. Jesús Chimal Monroy  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Contenido

ABREVIATURAS .....	3
RESUMEN .....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 El desarrollo de la extremidad	5
1.1.1 Eje próximo-distal	5
1.1.2 Eje antero-posterior	6
1.1.3 Eje dorso-ventral	7
1.2 Muerte celular programada durante el desarrollo de la extremidad	8
1.3 Apoptosis	12
1.4 Reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas	16
1.5 Matriz Extracelular	20
1.6 Integrinas	22
1.6.1 Estructura, distribución y funciones de las integrinas	22
1.6.2 La cinasa de adhesión focal en la señalización de las integrinas	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	29
3. HIPÓTESIS .....	31
4. OBJETIVOS .....	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	32
5.1 Anticuerpos, inhibidores y proteínas	32
5.2 Cultivo organotípico	32
5.3 Tinción con Lysotracker y tinción de esqueleto	33
5.4 Hibridación in situ	34
5.5 Inmunohistoquímica	36
5.6 Microscopía	38
6. RESULTADOS .....	39
6.1 La integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la muerte del tejido interdigital del ratón de manera independiente de RGD	39
6.2 FAK participa en el control de la muerte celular del interdígito	41
6.3 FAK regula la expresión de <i>bmp4</i> y <i>bmp7</i>	42
6.4 FAK está río abajo de AR, BMP7 y RGD	44
6.5 La presencia del fragmento bioactivo del versicano (DPEAAE) no se altera cuando se inhibe la señalización de FAK	46
6.6 La apoptosis está presente en los autópodos tratados con el inhibidor de FAK	48

7. DISCUSIÓN .....	51
7.1 Las integrinas regula la muerte celular del tejido interdigital a través de la señalización de FAK	51
7.2 La actividad de FAK es independiente de los factores proapoptóticos y no altera la expresión del fragmento bioactivo del versicano	53
7.3 FAK participa en la regulación de la fagocitosis de las células apoptóticas	54
8. CONCLUSIONES .....	57
9. REFERENCIAS.....	58

## Abreviaturas

AER - Cresta Ectodérmica Apical

$\beta_3$ - GPI – Glicofosfatidilinositol beta 3

BMP – Proteína Morfogenética del Hueso

DISC – Complejo de señalización inductor de muerte

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FAK – Cinasa de Adhesión Focal

FAT – Blanco de Adhesión Focal

FERM – 1-erzina-radixina-moesina

FGF – Factor de Crecimiento Fibroblástico

GDP – Guanosindifosfato

GTP – Guanosintrifosfato

Shh - Sonic Hedgehog

IAP – Inhibidor de Apoptosis

INZ – Zona Necrótica Interdigital

MFG-E8 – Factor Globular-EGF de la grasa de la leche 8

mTOR – blanco de Rapamicina de mamífero

NF $\kappa$ B – Factor nuclear potenciador de la cadena  $\kappa$  de la células B activadas

PI3K – Cinasa de Fosfatidilinositol 3

PLC – Fosfolipasa C

PS – Fosfatidilserina

RA – Ácido Retinoico

RALDH2 – Retinaldehído deshidrogenasa

RAR $\beta$  – Receptor del Ácido Retinoico  $\beta$

RNA – Ácido Ribonucleico

TGF $\beta$  – Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$

TRAIL – Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

ZPA – Zona de Actividad Polarizante

## Resumen

En la etapas finales del desarrollo de la extremidad, las células mesenquimáticas más dístales reciben señales que las dirigen a dos destinos celulares, hacia cartílago que dará origen a los dedos y hacia mesénquima indiferenciado que formará las membranas interdigitales. En especies con dedos libres como el ratón y el pollo, la membrana interdigital desaparece durante el desarrollo mediante la apoptosis, un tipo de muerte celular programada. Se conoce que existen factores de crecimiento que participan en el disparo de este proceso que culmina con la regresión del interdígito. Los pasos finales de la cascada molecular que conducen a la correcta regresión del interdígito implican la remodelación y degradación de la matriz extracelular (MEC) y la fagocitosis de las células apoptóticas. Las integrinas son receptores de membrana que unen las células a la MEC, se componen de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , y su activación dispara la señalización a través de la Cinasa de Adhesión Focal (FAK) por las principales cascadas moleculares que regulan sobrevivencia, proliferación y motilidad celular, entre otros. Las integrinas, además de reconocer diversas proteínas de la MEC, median interacciones célula-célula sirviendo algunas de receptores de reconocimiento de células apoptóticas. Tanto la comunicación de la célula con la MEC como el reconocimiento de las células apoptóticas por los fagocitos, son aspectos importantes del proceso de muerte celular programada que no han sido estudiados en detalle durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. Actualmente se desconoce el papel de las integrinas en el control de la muerte celular del interdígito.

En esta tesis se explora el papel de las integrinas, mediante su señalización a través de FAK, en la muerte del tejido interdigital con el uso de cultivos organotípicos de la extremidad embrionaria del ratón. Los resultados encontrados indican que FAK regula la expresión de *bmp4* y *bmp7* y, mas importante, que la inhibición de FAK inhibe la fagocitosis de las células apoptóticas, lo cual sugiere la participación de las integrinas y FAK en la regulación de este proceso.

## **1. Introducción**

### **1.1 El desarrollo embrionario de la extremidad**

En las primeras etapas del desarrollo embrionario, las extremidades de los vertebrados tetrápodos son prácticamente indistinguibles entre sí, sin embargo, a medida que avanza el desarrollo las extremidades se van diferenciando y el resultado final es una gran diversidad de extremidades adaptadas al ambiente en el que viven. A pesar de esta gran diferencia, los mecanismos moleculares y celulares que dan lugar a la formación de las extremidades están altamente conservados entre los tetrápodos. El primordio de la extremidad aparece en etapas tempranas del desarrollo como una protuberancia a los costados del embrión compuesta de tejido mesodérmico y cubierta por una capa de ectodermo. El tejido mesodérmico se diferenciará para dar lugar al cartílago, hueso y tendones; el ectodermo dará lugar a la piel y sus derivados; mientras que el músculo se diferenciará a partir de células precursoras derivadas de los somitas. La extremidad se va formando en cada uno de sus ejes tridimensionales y en las etapas finales, el tejido interdigital desaparece en especies con dedos libres mediante apoptosis.

A continuación, se dará una breve introducción sobre los mecanismos que regulan el desarrollo de la extremidad en cada uno de sus ejes, para seguir más adelante con el tema central de la tesis que involucra la muerte celular del interdígito y la posible participación de las integrinas en este proceso.

#### **1.1.1 Eje próximo-distal**

En el primordio de la extremidad existen tres centros de señalización interdependientes que controlan el crecimiento de la extremidad en sus ejes tridimensionales. El primero de éstos es la

Cresta Ectodérmica Apical (AER) que se localiza en la parte más distal del primordio y está formada por ectodermo indiferenciado (Figura 1); esta zona controla el crecimiento próximo-distal gracias a la acción de las proteínas de la familia de los Factores de Crecimiento Fibroblásticos (FGFs), principalmente FGF8, que se secretan hacia el mesodermo subyacente, manteniéndolo en un estado indiferenciado y proliferante. En experimentos en los que se remueve la AER, la extremidad queda truncada, mientras que la adición del FGF8 exógeno es capaz de mantener la extremidad en crecimiento. Además de FGF8, la actividad de la vía de señalización Wnt/ $\beta$  catenina, proveniente del ectodermo es importante para mantener el estado indiferenciado y proliferante de la extremidad (ten Berge, Brugmann et al. 2008). A medida que la extremidad crece, los elementos más proximales del esqueleto se forman; en primer lugar se forma el estilópodo (húmero o fémur), luego el zeugópodo (radio/ulna o tibia/fíbula) y finalmente el autópedo, la parte más variable de la extremidad entre los vertebrados que comprende los huesos carpo/tarso, metacarpos/metatarsos y dedos (Saunders 1948; Todt and Fallon 1986; Lewandoski, Sun et al. 2000; Fernandez-Teran and Ros 2008). En la Figura 1 se muestran las estructuras esqueléticas de la extremidad de varios vertebrados. Cada dígito del autópedo tiene una identidad diferente, dando lugar al eje antero-posterior, en donde el dedo más cercano al cuerpo es el anterior y el más alejado el posterior.

### **1.1.2 Eje antero-posterior**

La especificación de los dedos a través del eje antero-posterior se determina por la acción del morfógeno Sonic hedgehog (Shh) que se secreta desde la Zona de Actividad Polarizante (ZPA). Este centro de señalización se localiza en la región posterior del primordio y está formado por células mesodérmicas. Se forma un gradiente en donde la concentración y el tiempo de exposición al



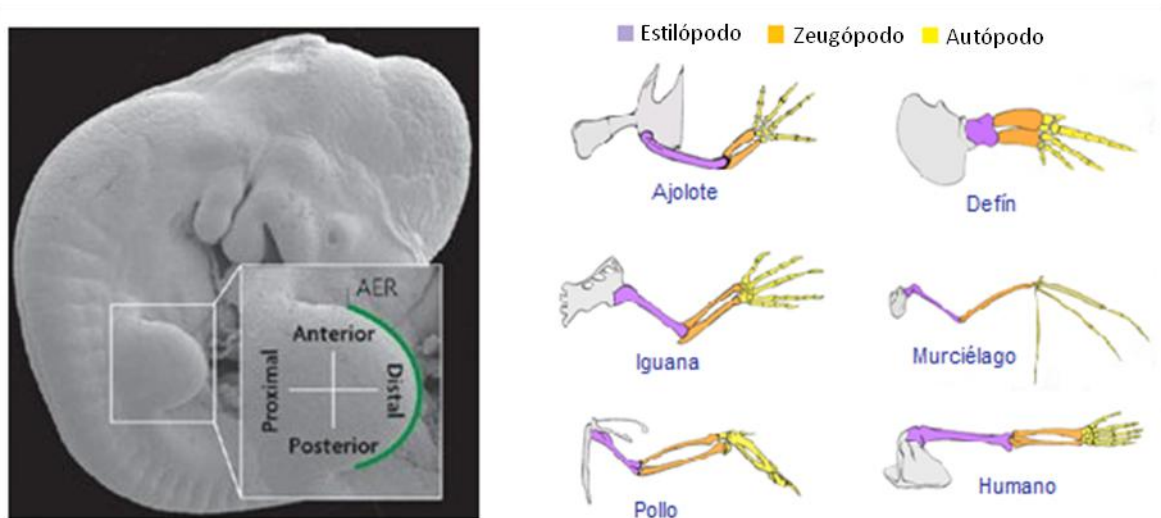
morfógeno va disminuyendo a través del eje de manera que el dedo mas posterior (meñique) recibe la concentración mas alta de Shh mientras que el dedo más anterior (pulgar) no recibe Shh, lo cual indica que éste se especifica en ausencia de Shh. Cuando la ZPA se trasplanta al mesodermo anterior de la extremidad, se generan duplicaciones con una simetría en imagen especular (McGlenn and Tabin 2006; Tickle 2006). Además de la ZPA, los interdígitos representan centros de señalización secundarios para especificar el número y la longitud de las falanges gracias a la activación de las proteínas señalizadoras SMAD1/5/8. El nivel de actividad de SMAD1/5/8 en el interdígito posterior a cada dedo correlaciona con la longitud y número de falanges del dedo (Suzuki, Hasso et al. 2008). Es decir, mientras más largo es un dedo, mayor actividad de SMAD1/5/8 hubo en el interdígito posterior a ese dedo.

### **1.1.3 Eje dorso-ventral**

El eje dorso-ventral está controlado por el ectodermo ventral y dorsal de la extremidad. El ectodermo dorsal expresa *Wnt7a* y *Lmx1b*. Cuando la expresión de cualquiera de estos dos genes se inhibe en ratones mutantes, se generan extremidades con estructuras biventrales. Por otro lado, el ectodermo ventral expresa el factor de transcripción *En1*, que al mutarlo genera extremidades con estructuras bidorsales. El receptor tipo I de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) se expresa también en el ectodermo ventral y se ha demostrado que su activación regula positivamente la expresión de *En1* y negativamente la expresión de *Wnt7a* (Parr and McMahon 1995; Loomis, Harris et al. 1996; Chen, Lun et al. 1998; Niswander 2003).

En las últimas etapas del desarrollo del autópodo, los condrocitos que prefiguran los dedos se diferencian y compactan dejando entre ellos un tejido indiferenciado que forma la membrana

interdigital. En especies con dedos libres con el ratón y el humano la membrana interdigital regresa por un proceso de muerte celular programada que se describirá a continuación.



**Figura 1.** Izquierda. Primordio de la extremidad del pollo en el que se muestran los ejes próximo-distal y antero-posterior así como la cresta ectodérmica apical (AER). A la derecha se muestra el patrón básico de la extremidad de los vertebrados, compuesta por el estilópodo, zeugópodo y autópodo. El estilópodo está compuesto por un elemento esquelético, el zeugópodo por dos elementos esqueléticos y el autópodo por varios elementos esqueléticos constituyendo la región variable entre las especies de tetrápodos (Figura adaptada de Abarca-Buis 2009 y Montero2007).

## 1.2 Muerte celular programada durante el desarrollo de la extremidad

La apoptosis es un proceso importante en el desarrollo que esculpe la morfología y la estructura de los órganos en desarrollo y elimina órganos o estructuras con funciones transitorias en el embrión (Zakeri and Lockshin 2008). En la extremidad embrionaria existen varias regiones de muerte celular que están altamente reguladas y ocurren en un espacio y tiempo definidos. A estas regiones se les denominan *zonas necróticas* porque, cuando fueron descritas por primera vez, el término apoptosis aún no estaba establecido. La *zona necrótica anterior* y la *zona necrótica*

*posterior* se localizan en los márgenes de la periferia de la extremidad en la zona posterior y anterior en los estadios tempranos de la extremidad. Así mismo, la zona de muerte denominada *parche opaco* se localiza entre los cartílagos de zeugópodo, para separar los huesos del radio y la ulna o de la tibia y la fíbula. La apoptosis también se localiza en los agregados precondrogénicos que van a dar lugar a las articulaciones y donde se van a establecer los precursores del músculo que migran desde la somitas. Sin embargo, la zona mas notable de apoptosis en la extremidad ocurre en el tejido mesodérmico que se localiza entre los dígitos determinada *zona necrótica interdigital (ZNI)* (Zuzarte-Luis and Hurlle 2002; Fernandez-Teran, Hinchliffe et al. 2006; Montero and Hurlle 2010).

En etapas tempranas de la formación del autópedo, las células mesodérmicas tienen el potencial de mantenerse como tejido indiferenciado o de diferenciarse en cartílago, el cual más tarde se convertirá en hueso (Ros, Piedra et al. 1997). La primera señal de diferenciación hacia cartílago comienza con la expresión de *Sox9*, un factor de transcripción que activa la transcripción de proteínas específicas del cartílago como colágena tipo II, agregano y proteoglicanos sulfatados (Healy, Uwanogho et al. 1996; Akiyama, Chaboissier et al. 2002; Karsenty 2008). La expresión de otras proteínas de la familia del Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), como la Activina A, Activina B y TGF $\beta$ 2 también son esenciales para la diferenciación de los condrocitos (Chimal-Monroy, Bravo-Ruiz et al. 1996; Ganan, Macias et al. 1996; Chimal-Monroy, Rodriguez-Leon et al. 2003). Las células mesodérmicas que no se incorporaron al destino condrocítico de los dedos se mantienen como tejido indiferenciado en los interdígitos, que puede permanecer como en el caso de los murciélagos y patos diferenciándose a tejido conectivo (Ganan, Macias et al. 1998), o desaparecer como en el pollo, ratón y humano generando dedos libres. En especies con dedos libres, la inhibición de la muerte interdigital genera sindactilia del tejido blando (Sears, Behringer et al. 2006).

Se ha identificado que la muerte del tejido interdigital requiere de la regulación de la señalización de tres grupos de factores de crecimiento: los ya mencionados FGFs que se secretan desde la AER, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y el Ácido Retinóico (RA).

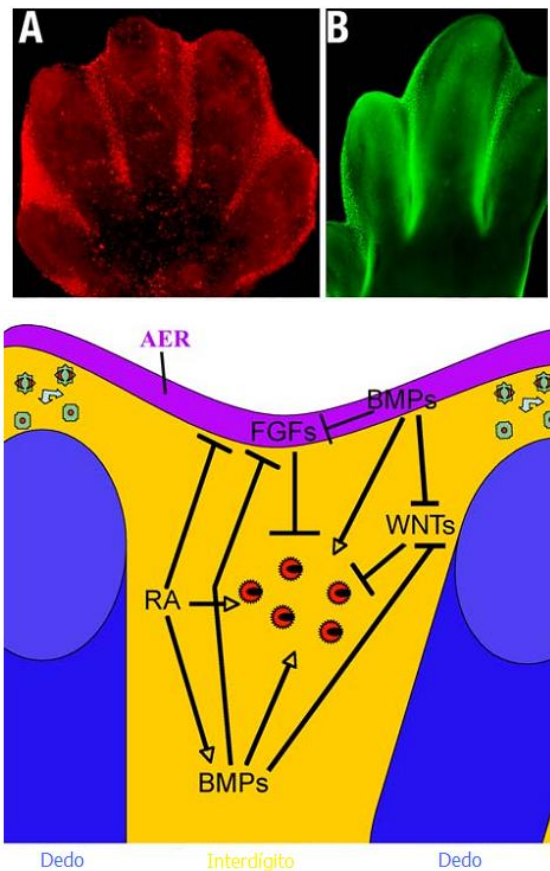
Los FGFs tienen una función proliferativa y de sobrevivencia. El inicio de la muerte interdigital coincide con la disminución de la expresión de *fgf8* en la AER. Al agregar FGFs exógeno en la etapa de muerte, la muerte celular del interdígito se inhibe (Macias, Ganan et al. 1996), esto se observa en síndromes con sindactilia en humanos que tienen mutaciones que provocan la activación constitutiva de los receptores de FGFs (Wilkie, Patey et al. 2002).

Las BMPs se expresan tanto en la AER como en el mesodermo indiferenciado y tienen varias funciones durante el desarrollo de la extremidad, como el establecimiento del patrón dorso-ventral, la especificación de las articulaciones y la formación del cartílago. El tejido interdigital expresa *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* y *Bmp7* y su expresión precede al inicio de la muerte en esta zona (Ganan, Macias et al. 1996; Geetha-Loganathan, Nimmagadda et al. 2006). La aplicación local de perlas impregnadas con cualquiera de estos BMP en el interdígito induce muerte celular masiva por apoptosis (Macias, Ganan et al. 1997). De manera complementaria, experimentos en los que se bloquea la acción de los BMP en el interdígito, provoca la inhibición de la muerte y sindactilias. Las especies de animales que tienen dedos palmeados, como el pato y el murciélago, la muerte celular del interdígito es bloqueada naturalmente por la presencia de Gremlin1, antagonista de BMP (Merino, Rodriguez-Leon et al. 1999). Además, en el murciélago, FGF8 se expresa en el interdígito (Zuzarte-Luis and Hurlle 2002; Weatherbee, Behringer et al. 2006) induciendo su sobrevivencia.

El ácido retinoico (AR) es un metabolito derivado del retinol (vitamina A) que tiene receptores nucleares que se expresan durante el desarrollo de la extremidad. En el tejido interdigital se

expresa el receptor *RARβ* y la enzima que cataliza la síntesis de AR, *Raldh2* (Dolle, Ruberte et al. 1989). El tratamiento local de AR acelera la muerte del interdígito mientras que su inhibición mediante la aplicación de antagonistas o la generación de ratones mutantes para los receptores de AR provoca sindactilias (Lohnes, Mark et al. 1994; Rodriguez-Leon, Merino et al. 1999). Se ha sugerido que el efecto sobre la apoptosis por parte del AR está mediada por las BMPs, ya que la señalización de AR provoca un aumento en la expresión de BMPs y cuando se pone AR en presencia de un antagonista de BMPs, la muerte celular se inhibe (Rodriguez-Leon, Merino et al. 1999). De manera interesante, el bloqueo local de la función de los receptores del AR con antagonistas específicos provoca la formación de un dedo ectópico, lo cual sugiere que el AR, además de inducir la muerte celular del interdígito, bloquea su potencial condrogénico (Rodriguez-Leon, Merino et al. 1999; Kuss, Villavicencio-Lorini et al. 2009). De esta manera, el modelo propone que AR estimula la expresión de BMP en el interdígito, el cual a su vez inhibe la señal proliferativa de WNT y de FGF8, promoviendo la apoptosis (Figura2).

La magnitud en la presencia de muerte de la ZNI y su importancia para esculpir la morfología de los dedos varía entre los tetrápodos. En aves, la muerte celular del interdígito es intensa y se acompaña de la regresión de los vasos sanguíneos y de la matriz extracelular. En el ratón, esto se acompaña además de un proceso de crecimiento celular diferencial, caracterizado por un intenso crecimiento de las puntas de los dedos y una reducción en el crecimiento de la membrana interdigital (Salas-Vidal, Valencia et al. 2001).



**Figura 2.** Muerte del tejido interdigital de la extremidad embrionaria del ratón teñida con la técnica de TUNEL (A) y del pollo teñida con naranja de acridina (B). Abajo se muestra el modelo de los principales factores involucrados en la estimulación de la muerte celular del interdígito. La cresta ectodérmica apical (AER) se muestra en morado, el interdígito donde se localiza la ZNI en amarillo y los dígitos en azul. Los BMPs de la AER inhiben la señalización proliferativa (células verdes) y de supervivencia de los FGFs y de WNT en el interdígito mientras que promueven la apoptosis (células rojas), a su vez, el Ácido Retinoico (RA) promueve la muerte celular e induce la expresión de BMPs. Adaptado de (Montero and Hurlé 2010)

### 1.3 Apoptosis

El número de células en un organismo está altamente regulado, no solo por la tasa de división celular sino también por la tasa de muerte celular. Cuando las células ya no se necesitan se activa una cascada de muerte celular programada mediada por apoptosis. Durante el desarrollo de los vertebrados, estos procesos de apoptosis son sorprendentes. Por ejemplo, durante el desarrollo

del sistema nervioso central, miles de neuronas mueren poco después de ser formadas; durante la metamorfosis del renacuajo en rana, la apoptosis provoca la regresión de la cola. En los tetrápodos, la apoptosis en el autópodo es importante para esculpir la morfología de la extremidad.

Las células que mueren por apoptosis lo hacen sin dañar a sus vecinas, se encojen y condensan, el DNA se fragmenta y la envoltura nuclear y el citoesqueleto se desensamblan. Posteriormente, se forman cuerpos apoptóticos delineados por membrana celular conteniendo diversos organelos celulares que son fagocitados rápidamente por fagocitos profesionales y no profesionales (Kerr, Wyllie et al. 1972).

La apoptosis depende de la activación de proteínas proapoptóticas que inician una cascada proteolítica irreversible. Estas enzimas proteolíticas que cortan en residuos de ácido aspártico son llamadas caspasas y están presentes en todas las células en su forma inactiva denominada procaspasa. Hay dos tipos de caspasas, las iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) que son activadas por vías de señalización proapoptóticas y las efectoras (caspasas 3, 5 y 7) que son activadas por las caspasas iniciadoras e inician una cascada de amplificación formando complejos proteolíticos que culminan con la apoptosis (Thornberry and Lazebnik 1998). Las caspasas son activadas por señales proapoptóticas que pueden venir del interior (vía intrínseca) o del exterior de la célula (vía extrínseca) (Figura 3).

En la vía intrínseca, señales proapoptóticas como el estrés celular (hipoxia, daño al DNA, agotamiento de nutrientes o factores de crecimiento, entre otros) o señales del programa de desarrollo, activan proteínas que alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial induciendo la liberación del citocromo c. La permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por proteínas de la familia Bcl-2, las cuales se dividen en proapoptóticas (como Bax,

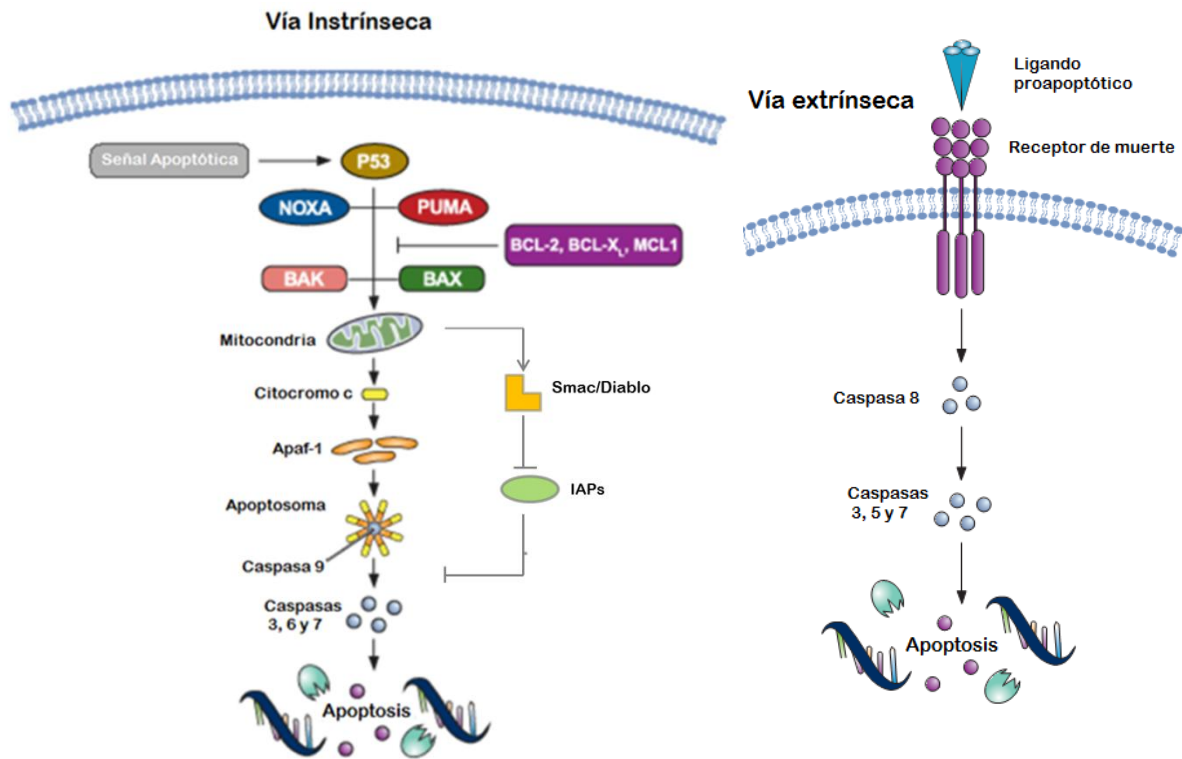
Bak, Bad, Noxa y Puma) y antiapoptóticas (como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>). Las proteínas antiapoptóticas inhiben la permeabilización provocada por Bax y Bak mientras que otras proteínas proapoptóticas como Bid y Noxa inhiben la acción antiapoptótica de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Coultas and Strasser 2003). Un ligero desbalance en esta regulación, provocado por el aumento en la concentración de proteínas proapoptóticas, conduce a la liberación del citocromo c y su unión con la proteína SMAC/DIABLO, la cual se activa para inhibir directamente a otras proteínas antiapoptóticas denominadas IAPs que están inhibiendo la activación de las procaspasas iniciadoras (Deveraux and Reed 1999; Henry-Mowatt, Dive et al. 2004). Además, se forma un complejo multiproteico formado por el citocromo c, apaf-1 y caspasa 9 denominado apoptosoma que activa a las procaspasas efectoras (Fulda and Debatin 2006).

La vía extrínseca comienza desde fuera de la célula a través de la activación de los receptores de muerte por ligandos proapoptóticos específicos. Estos ligandos incluyen TRAIL y FasL que se unen a los receptores DR5 y Fas, respectivamente (Fulda and Debatin 2006). La activación de estos receptores provoca el reclutamiento y la activación de las procaspasas iniciadoras 8 y 10 formando un complejo de señalización inductor de muerte denominado DISC, el cual activa a las caspasas efectoras 3, 5 y 7 (Kischkel, Hellbardt et al. 1995).

Los lisosomas también juegan un papel importante en la muerte celular programada del tejido interdigital. La catepsina B, D y L son proteasas que se encuentran en el interior de los lisosomas, se ha demostrado que se expresan en las células mesenquimales del interdígito durante las etapas de muerte. Así mismo la permeabilización de la membrana lisosomal se ha observado durante la regresión del interdígito (Zuzarte-Luis, Montero et al. 2007). Las catepsinas pueden inducir la activación de las caspasas y posiblemente la permeabilización de la membrana mitocondrial lo cual sugiere su participación en la inducción de apoptosis (Ishizaki, Jacobson et al. 1998; Jaattela, Cande et al. 2004). La inhibición de las caspasas utilizando ratones mutantes o inhibidores de



amplio espectro de estas, así como la inhibición de las catepsinas por separado, no inhibe la muerte celular en el interdígito. Sin embargo, cuando se inhibe simultáneamente las caspasas y las catepsinas, la muerte celular del interdígito se inhibe lo cual sugiere que ambas vías cooperan para inducir la apoptosis (Zuzarte-Luis, Montero et al. 2007).



**Figura 3.** Representación esquemática de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. En la vía intrínseca la señal proapoptóticaintracelular activa a p53 el cual activa la trascricpción de los genes proapoptóticos como Noxa, Puma, Bax y Bak, los cuales normalmente están siendo inhibidos por las proteínas Bcl-2. El aumento de las proteínas proapoptóticas produce la liberación del citocromo c de la mitocondria y su asociación con la caspasa 9 formando el apoptosoma que activa a las caspasas efectoras. Por otra parte, el complejo Smac/Diablo liberado de la mitocondria inhibe a las IAPs que normalmente están inhibiendo la activación de las caspasas. En la vía extrínseca, un ligando proapoptótico (eg. FasL) se une a los receptores de muerte de la célula (eg. Fas) los cuales inducen la activación de la caspasa 8, la cual a su vez activa a las caspasas efectoras, disparando la apoptosis.Adaptado de (Ashkenazi 2002).

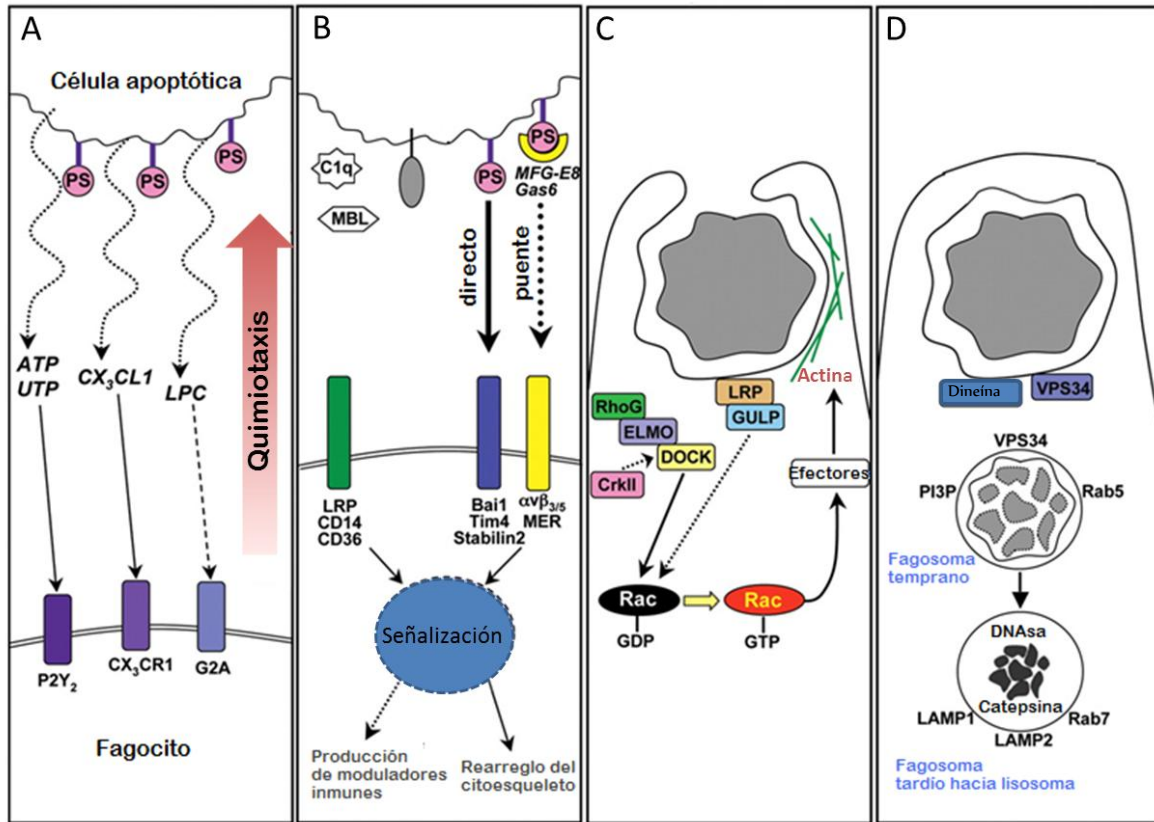
Recientemente se reveló la actividad de tres diferentes DNAsas, que colaboran en el proceso de apoptosis del tejido interdígital. En las etapas tempranas de la apoptosis, caspasa 3 activa la DNasa neutra CAD, posteriormente la actividad de las DNasa ácidas L-DNase II y la lisosomal DNase IIB aumenta considerablemente coincidiendo con un proceso de acidificación del interdígito (Montero, Lorda-Diez et al. 2010). Esta acidificación proviene tanto de las células mesenquimáticas del interdígito como de los fagocitos que eliminan las células apoptóticas.

#### **1.4 Reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas**

La eliminación de las células apoptóticas es un proceso rápido y eficiente, por medio del cual se evita que la célula se convierta en necrótica y libere componentes tóxicos y antigénicos al tejido circundante. Además, los fagocitos que eliminan las células apoptóticas producen citosinas antiinflamatorias que suprimen la respuesta inmune contra los restos de la célula apoptótica, de esta manera, se evita que el cuerpo inicie una reacción inflamatoria autoinmune (Fadok, Bratton et al. 1998). De acuerdo con esto, defectos en el proceso de eliminación de células apoptóticas se han relacionado con desordenes inflamatorios o autoinmunes tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso (Rosen and Casciola-Rosen 1999; Gaipf, Franz et al. 2004).

Los fagocitos se denominan “profesionales” o “no profesionales” dependiendo de su eficiencia para llevar a cabo la fagocitosis. Los fagocitos “profesionales” como los macrófagos y células dendríticas tienen mayor capacidad de engullir células apoptóticas, mientras que los fagocitos “no profesionales” como las células epiteliales, los fibroblastos y las células mesenquimáticas, lo hacen a un ritmo mucho menor; la principal diferencia entre ellos radica en los receptores de membrana que reconocen objetos extraños presentes en los fagocitos “profesionales”, sin embargo, los pasos que se siguen en el proceso de fagocitosis son similares entre ambos (Parnaik, Raff et al. 2000).

El proceso de apoptosis dispara cambios en las células apoptóticas requeridos para que los fagocitos las reconozcan y las engullan. En las primeras etapas, las células apoptóticas liberan moléculas quimiotácticas (Figura 4A) como la lisofosfatidilcolina (LPC) (Kim, Gershov et al. 2002) que atraen a los fagocitos al sitio donde están. Además, la membrana de las células apoptóticas exhibe moléculas que están ausentes en las células sanas. La señal apoptótica mejor caracterizada es la exposición del fosfolípido aniónico fosfatidilserina (FS), que normalmente se encuentra en la capa interna de la membrana celular (Fadok, Voelker et al. 1992). Los fagocitos reconocen a FS directamente o por medio de moléculas solubles opsonizantes que hacen un puente entre FS y los receptores fagocíticos. La anexina I, por ejemplo, es una proteína intracelular que durante la apoptosis se transloca al exterior de la célula para servir como puente entre la FS y el receptor de FS en los fagocitos. Otras moléculas opsonizantes que cumplen esta función son MFG-E8 que se une al receptor de vitronectina (integrina  $\alpha_v\beta_3$ ), Gas6 que se une a Mer, y  $\beta_2$ -GPI que se une a su receptor en las células fagocíticas (Lauber, Blumenthal et al. 2004). Además de éstos, otros receptores de la familia *scavengery* de la familia de las integrinas son esenciales para el correcto reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas (Figura 4B).



**Figura 4.** Proceso de reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas. La célula manda señales quimio-atrayentes hacia el fagocito (A), el fagocito reconoce a la célula por medio de receptores (B), se activa la vía de señalización para engullir a la célula (C) y posteriormente es procesada en los fagosomas tempranos y tardíos. Adaptado de (Elliott and Ravichandran 2010).

Una vez que se ha reconocido a la célula apoptótica, el fagocito tiene que remodelar el citoesqueleto de actina para rodear y engullir a la célula. Los pasos implicados en la activación del fagocito por los receptores de membrana hasta la remodelación del citoesqueleto no han sido totalmente detallados, sin embargo, mediante estudios en el nematodo *C. elegans* se han identificado dos vías de señalización principales implicadas en este proceso. El primer módulo de señalización lo componen las proteínas ced-1, ced-6 y ced-7 cuyos homólogos en mamíferos son CD91, GULP y ABC1, respectivamente. El segundo lo componen ced-2, ced-5 y ced-12 que

corresponden en mamíferos a CrkII, Dock 180 y ELMO (Gumienny, Brugnera et al. 2001). Ambas vías parecen converger en ced-10 o su homólogo Rac (Kinchen, Cabello et al. 2005). La función e interacción entre ced-1/CD91, ced-6/GULP y ced-7/ABC1 no es clara aún, pero se ha propuesto que ced-7/ABC1 participa en la externalización de FS de la célula apoptótica, el cual a su vez es reconocido por ced-1/CD91, quien transduce la señal hacia ced-6/GULP. Se ha demostrado que la vía de señalización de ced-2/CrkII, ced-5/Dock180 y ced-12/ELMO, es esencial en la eliminación de las células apoptóticas tanto en mamíferos como en *C. elegans* (Figura 4C) (Gumienny, Brugnera et al. 2001), además la sobreexpresión de ced10/Rac, es capaz de rescatar los defectos de las mutantes de esta vía (Reddien and Horvitz 2000). Rac es una proteína G de la familia de las GTPasas Rho que está involucrada en la remodelación del citoesqueleto, la formación de filipodios y lamelipodios. Se ha demostrado que ELMO y Dock180 funcionan juntos como un factor de intercambio de GDP-GTP para Rac, sin embargo no se sabe cuáles son los efectores río arriba que activan este complejo (Brugnera, Haney et al. 2002).

Existe evidencia de que las integrinas pueden jugar un papel importante en la activación de la vía ced-2/CrkII--ced-5/Dock180--ced-12/ELMO. Akakura et al. (2004) demostraron que la proteína opsonizante MFG-E8 es capaz de activar Dock180-Rac vía la integrina  $\alpha\beta 5$ . Recientemente, Tsung-Yuan Hsuet al. demostró que la integrina INA, una integrina  $\alpha$  de *C. elegans*, es un receptor de fagocitosis que activa la vía ced-2-5-12 mediante la activación de la cinasa de tirosina SRC-1 en el nematodo (Hsu and Wu 2010).

Una vez que la célula apoptótica ha sido integrada al fagocito por la formación del fagosoma, se inicia la maduración de éste, que consiste en su acidificación y fusión con los compartimentos celulares ácidos como los endosomas y lisosomas. La proteína de la clase III de las cinasas de fosfatidilinositol (PI3K) llamada Vps34, es importante para el cierre y maduración del fagosoma (Backer 2008)(Figura 4D). En un principio, el fagosoma contiene una muestra del medio

extracelular neutro, una vez sellado, el fagosoma se fusiona con endosomas tempranos adquiriendo un pH  $\approx$  6 (fagosoma temprano), después se fusiona con los endosomas tardíos adquiriendo un pH de 5.5-6 (fagosoma tardío) y finalmente con los lisosomas acidificándose a un pH de entre 4.5 y 5.5 (fagolisosoma) (Vieira, Botelho et al. 2002). El colorante fluorescente LysoTracker, fluoresce a un pH de 5.2 representando así un buen marcador de que las células apoptóticas están siendo fagocitadas y por lo tanto un marcador indirecto de la muerte celular.

### **1.5 Matriz Extracelular**

La matriz extracelular (MEC) es el componente no celular presente en todos los tejidos que le proporciona soporte y estructura, así como señales bioquímicas y biomecánicas que influyen en las células para regular la morfogénesis y reparación de los tejidos, la diferenciación y homeostasis (Frantz, Stewart et al. 2010).

La regresión del interdígito requiere no sólo de la muerte del tejido interdigital, sino también de la remodelación de la MEC. Durante el desarrollo, la MEC se somete a complejas remodelaciones para dar lugar a las nuevas estructuras que exigen los programas morfogenéticos de los diversos organismos. La importancia de la MEC se ve reflejada en síndromes y enfermedades en los que algunos de sus componentes están presentes de manera anormal. Por ejemplo, el síndrome de Marfan, caracterizado por una gran cantidad de anomalías que van desde anomalías esqueléticas hasta la dilatación de la aorta, es provocado por mutaciones en el gen de la proteína Fibrilina-1 (Robinson and Booms 2001). Mutaciones en la Fibrilina-1 están relacionadas con la aparición de sinpolidactidia y mutaciones en la Fibrilina-2 con aracnodactilia, las cuales son anomalías esqueléticas de la formación de los dedos (Debeer, Schoenmakers et al. 2002; Jarvelainen, Sainio et al. 2009).

La MEC está compuesta por dos clases principales de macromoléculas: los proteoglicanos, y las proteínas fibrosas.

Las principales proteínas fibrosas son las colágenas, elastinas, fibronectinas y lamininas. Éstas forman fibras que le dan volumen, estructura y fuerza a los tejidos y contienen sitios de reconocimiento para el anclaje a otras proteínas. Los proteoglicanos por su parte, son proteínas unidas covalentemente a grandes cadenas de glicosaminoglicanos que llenan la mayoría del espacio intersticial en la forma de un gel hidratado y además de tener una función amortiguadora y de hidratación, proveen de un reservorio para factores de crecimiento solubles como FGFs y EGFs (Iozzo and Murdoch 1996).

Los componentes de la MEC varían de tejido a tejido. Las células secretan su matriz extracelular dependiendo de su tipo y estado de diferenciación, por ejemplo uno de los marcadores de la diferenciación de los tendones y del cartílago durante el desarrollo embrionario es la expresión de tenascina y colágena tipo II, respectivamente. Los componentes de la MEC son altamente dinámicos durante el desarrollo de los órganos y estructuras embrionarias. Por ejemplo, durante el desarrollo de la extremidad, el tejido interdigital es rico en proteoglicanos y fibronectina. Ésta está presente en el mesénquima del autópodo y a medida que el desarrollo avanza, su expresión disminuye en el sitio donde los dígitos se forman y permanecen únicamente en el tejido interdigital (Dessau, von der Mark et al. 1980).

La remodelación de la MEC es un proceso complejo que requiere de enzimas proteolíticas de matriz llamadas metaloproteasas (MMPs, ADAMs y ADAM-TS), que son a su vez reguladas por proteínas inhibidoras de metaloproteasas (TIMPs). Además de cambiar la arquitectura de la MEC, las metaloproteasas liberan fragmentos bioactivos y factores de crecimiento y revelan sitios de reconocimiento para otras proteínas que influyen en el comportamiento celular, siendo así

componentes importantes en la regulación del destino celular (Mott and Werb 2004). Recientemente, McCulloch *et. al.*(2009) demostraron que durante el desarrollo del autópodo del ratón, el proteoglicano versicano es cortado en la región del interdígito generando un fragmento bioactivo (DPEAAE) que induce la muerte celular del tejido interdigital. Al crear ratones mutantes para las ADAM-TS que degradan el versicano, se generaron sindactilias mientras que la sola aplicación del fragmento bioactivo en los interdígitos indujo muerte celular de manera independiente a BMP (McCulloch, Nelson et al. 2009).

La matriz extracelular se comunica con las células a través de las integrinas, a continuación se profundizará en sus funciones, características y propiedades de señalización.

## **1.6 Integrinas**

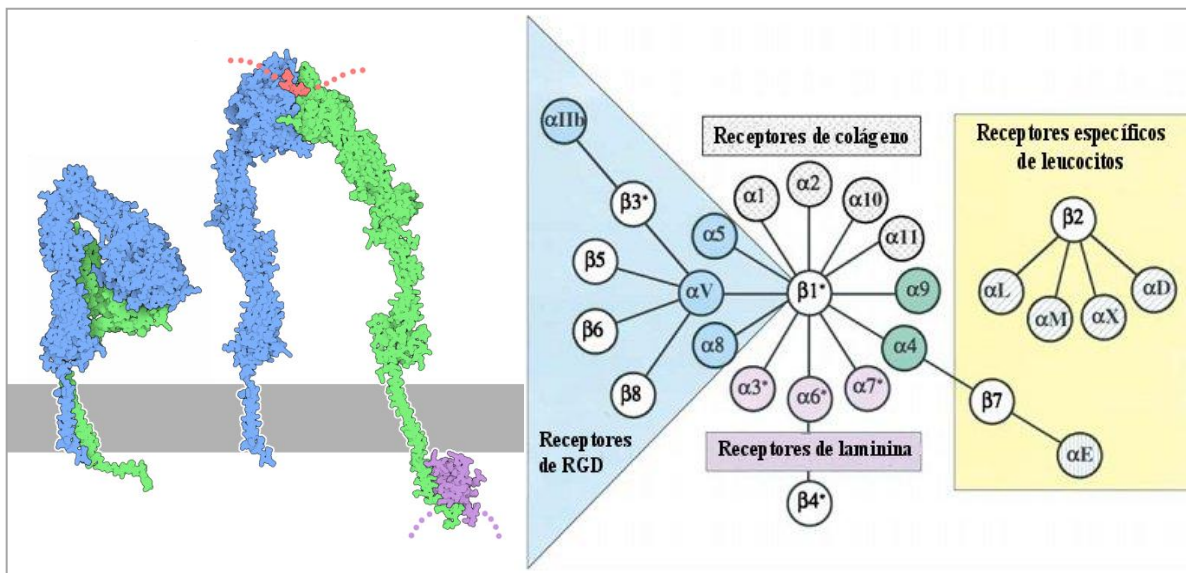
### **1.6.1 Estructura, distribución y funciones de las integrinas**

Las integrinas son receptores de adhesión que median la comunicación entre las células y la MEC. Están ampliamente distribuidas entre los metazoarios, desde las esponjas hasta los mamíferos y, en los vertebrados, también participan mediando interacciones célula-célula. Las integrinas son heterodímeros formados por glicoproteínas unidas por enlaces no covalentes. Se forman de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , cada una con un segmento transmembranal, un largo dominio extracelular con sitios de unión a cationes divalentes y a proteínas de la MEC y una cola corta citoplásmica. La gran familia de las integrinas en mamíferos está compuesta por 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  que juntas forman 24 receptores heterodiméricos conocidos, con especificidad y propiedades de señalización diferentes (Figura 5).

Las integrinas se pueden dividir en varias subfamilias dependiendo de sus relaciones evolutivas, especificidad por ligandos o por su expresión restringida en las células sanguíneas. La especificidad



por proteínas de la MEC depende de la subunidad  $\alpha$  de la integrina, sin embargo, ambas subunidades hacen contacto con el ligando lo cual se requiere para su activación; el grupo de receptores de colágeno lo componen las integrinas  $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ,  $\alpha10$ ,  $\alpha11$ ; los receptores de laminina son  $\alpha3$ ,  $\alpha6$ ,  $\alpha7$  y los receptores de RGD (fibronectina) los conforman las subunidades  $\alpha5$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha8$  y  $\alpha11b$ . Las integrinas que se expresan únicamente en los leucocitos son las  $\alpha L$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha X$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$  y  $\beta2$  (Hynes 2002) (Figura 5).



**Figura 5.** A la derecha se muestra un modelo de las integrinas en su forma inactiva y activa, en azul se muestra la subunidad  $\alpha$ , en verde la subunidad  $\beta$ , en rosa se representa una proteína de la MEC y en morado las proteínas adaptadoras que se unen a la cola citoplásmica de la subunidad  $\beta$ , en gris se muestra la membrana plasmática. A la izquierda se muestra la familia de las integrinas de mamíferos, el color de las subunidades  $\alpha$  indica su relación evolutiva y el asterisco en las subunidades  $\beta$  indica la existencia de procesamiento alternativo del gen. Adaptado de (Hynes 2002).

La importancia de las integrinas se ve reflejada en los experimentos *knock-out* en los que los fenotipos de cada mutante son diferentes y van desde anomalías en la función de los

leucocitos ( $\alpha$ L,  $\alpha$ M,  $\alpha$ E,  $\beta$ 2,  $\beta$ 7) y en la angiogénesis ( $\alpha$ 1,  $\beta$ 3); hasta defectos en la gastrulación ( $\beta$ 1), desarrollo ( $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ v,  $\beta$ 8) y letalidad perinatal ( $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ v,  $\beta$ 4,  $\beta$ 8) (Hynes 1996).

Las integrinas generan un puente físico entre la MEC y el citoesqueleto de actina de las células, lo que permite una transmisión bidireccional de señales mecánicas y bioquímicas a través de la membrana plasmática para regular una gran variedad de funciones como la migración, crecimiento, sobrevivencia, proliferación, y diferenciación celular. Además, su sobre-activación en cáncer ha sido relacionada con la progresión e invasión de tumores (Guan 2010).

Cuando las células pierden adhesión a la MEC, mueren por apoptosis, a este proceso se le denomina *anoicis*. Este tipo de muerte es importante para mantener la integridad de los tejidos y prevenir que las células que pierden contacto con sus vecinas se establezcan en otros lugares, y proliferen aberrantemente. También la anoicis juega un papel importante en la involución de los tejidos, por ejemplo, durante el desarrollo temprano del embrión del ratón, la células ectodérmicas que no están ancladas a la membrana basal, mueren por apoptosis formando la cavidad proamniótica (Coucovanis and Martin 1995). La ligación de las integrinas con la MEC activa vías de señalización que frenan la apoptosis, por ejemplo, induce la transcripción de la proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y las IAPs e induce la fosforilación y degradación de la proteína proapoptótica Bad, es por eso que la pérdida de adhesión suprime esos frenos y provoca anoicis (Matter and Ruoslahti 2001; Stupack and Cheresch 2002). Asimismo, la pérdida de adhesión de las integrinas puede promover la apoptosis mediante el reclutamiento y activación de la caspasa-8, a lo cual se le llama “muerte mediada por integrinas” (Cheresch and Stupack 2002).

La integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 es una de las principales integrinas que se unen a fibronectina en su región conformada por el tripéptido arginina-glicina-aspartato (RGD), la fibronectina es la proteína fibrosa de la MEC más abundante en el desarrollo embrionario. Se han determinado algunas

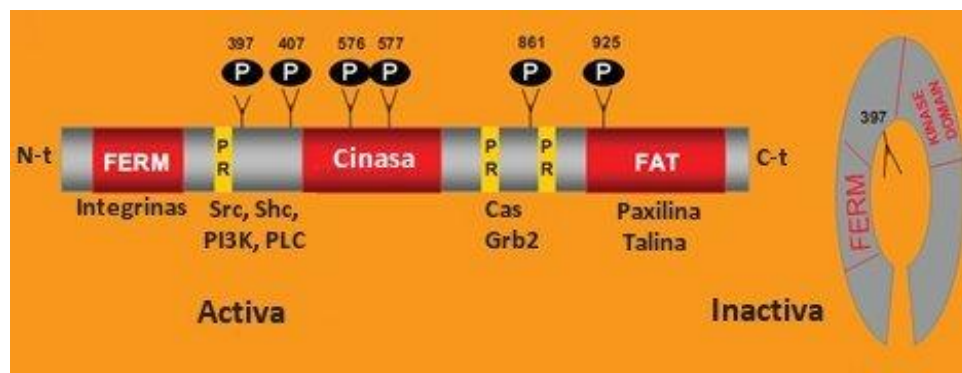
funciones de esta integrina analizando los efectos que provoca su deficiencia, por ejemplo, se ha observado que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  es necesaria para la regulación de la migración de las neuronas corticales durante el desarrollo del cerebro del ratón (Marchetti, Escuin et al. 2010) y las integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha v$  regulan la remodelación de la vasculatura del corazón en desarrollo (van der Flier, Badu-Nkansah et al. 2010). Resultados del laboratorio demostraron que cuando se bloquea la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en el zeugópodo del ratón en desarrollo, se genera una articulación ectópica sugiriendo su participación en la diferenciación de las articulaciones (Garcíadiego-Cazares, Rosales et al. 2004). Por otra parte, estudios recientes en el laboratorio (no publicados) señalan una disminución en la muerte celular del interdígito cuando se coloca anticuerpos bloqueadores de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en cultivos organotípicos de la extremidad embrionaria del ratón, lo cual nos llevó a preguntarnos sobre su función en este proceso.

### **1.6.2 Señalización de las integrinas y participación de FAK**

El fragmento citoplásmico de las integrinas es corto y desprovisto de actividad enzimática, por lo tanto, la señalización de las integrinas está mediada por la asociación con proteínas adaptadoras que conectan la cola citoplásmica de la subunidad  $\beta$  con el citoesqueleto de actina, con cinasas citoplásmicas y con receptores de factores de crecimiento.

Las proteínas de la MEC se asocian con gran cantidad de integrinas en la misma célula que se agrupan en complejos llamados de adhesión focal. Estos complejos reclutan proteínas adaptadoras como talina, vinculina, paxilina y  $\alpha$ -actinina que se unen al citoesqueleto de actina. Asimismo, reclutan cinasas citosólicas que inician la activación de las principales vías de señalización. La cinasa de adhesión focal (FAK) es el centro donde se inicia la señalización. FAK es una cinasa de tirosinas codificada por un gen altamente conservado entre las especies que

contiene una región central con actividad enzimática, una región N-terminal que alberga un dominio FERM y una región C-terminal con un dominio FAT. El residuo Y397, adyacente al dominio de cinasa, se autofosforila en respuesta a la asociación de las integrinas en los complejos de adhesión focal. Esta autofosforilación aumenta la actividad catalítica de FAK y crea sitios de unión para dominios SH2 que permiten la asociación de otras cinasas como Src, Fyn y PI3K. La unión de Src provoca su activación y fosforila otros residuos de FAK incluyendo Y576, Y577, Y861 y Y925 lo que resulta en su completa activación y la generación de sitios de unión a otras proteínas adaptadoras como Grb y Cas. El dominio FERM funciona como un regulador negativo de la actividad de FAK en ausencia de estímulo, y el dominio FAT interactúa directamente con las proteínas de adhesión focal talina y paxilina (van Nimwegen and van de Water 2007; Parsons, Slack-Davis et al. 2008) (Figura 6).



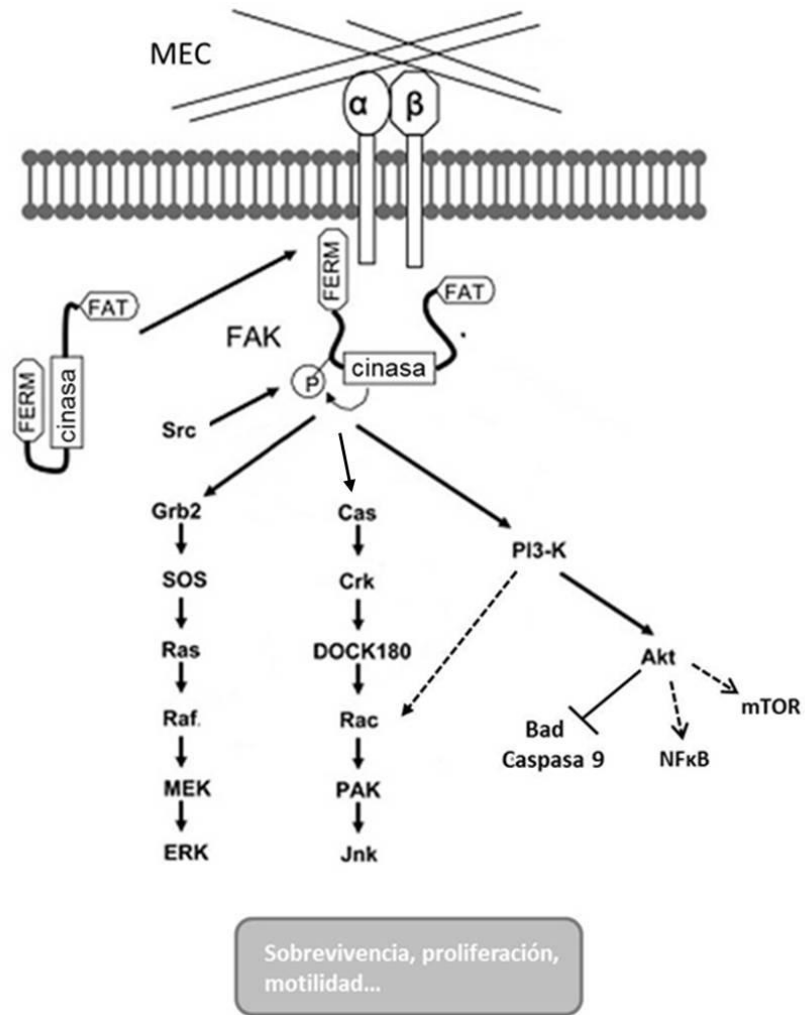
**Figura 6.** Estructura esquemática de FAK. El dominio FERM localizado en la región amino terminal (N-t) interactúa con la cola citoplásmica de la cadena  $\beta$  de la integrina en respuesta a la activación y agrupamiento de las integrinas, permitiendo la autofosforilación de FAK en la tirosina 397. En ausencia de estímulo, el dominio FERM actúa como un regulador negativo interactuando con el dominio de cinasa previniendo la autofosforilación en Y397. La autofosforilación en Y397 estimula la actividad catalítica del dominio cinasa permitiendo la unión de otras proteínas en los sitios ricos en prolina (PR) como Src, Pi3K, Cas y Grb2. La región carboxilo terminal (C-t) contiene un sitio FAT que media la colocación de FAK en los sitios de adhesión focal uniéndose a paxilina y talina. Adaptada de (Bolos, Gasent et al. 2010)

La unión de tan diversas proteínas adaptadoras confiere a FAK la capacidad de activar varias vías de señalización: La activación de PI3K señala a través de Akt lo cual inhibe la transcripción de proteínas proapoptóticas promoviendo la supervivencia celular (Reiske, Kao et al. 1999). Asimismo, la activación de NFκB (Scatena, Almeida et al. 1998) y de mTOR (Ashton, Morton et al. 2010) a través de Akt ha sido reportada. Grb activa la señalización de Ras-MAPK lo cual induce proliferación (Schlaepfer, Hanks et al. 1994). Por su parte, Cas es capaz de activar Crk que inicia la remodelación del citoesqueleto a través de la activación de Rac regulando así la motilidad celular (Polte and Hanks 1995) y la proliferación a través de la activación de JNK (Dolfi, Garcia-Guzman et al. 1998) (Figura 7).

El mutante nulo de FAK es letal desde etapas tempranas del desarrollo y exhibe defectos en el desarrollo del mesodermo y reducción en la motilidad de sus células (Ilic, Furuta et al. 1995). FAK ha demostrado ser esencial en varios procesos del desarrollo, por ejemplo, en la angiogénesis y vasculogénesis (Lim, Chen et al. 2010) y en la condensación de los precondrocitos y la subsecuente diferenciación del cartílago (Bang, Kim et al. 2000).

También se ha evaluado el papel de las integrinas y de FAK en interacciones célula-célula, desde nemátodos hasta mamíferos pasando por insectos. En *C. elegans* la integrina INA-1 ( $\alpha$ ) medía la fagocitosis de las células apoptóticas de manera independiente de FAK (Hsu and Wu 2010). Sin embargo, en insectos la subunidad  $\beta$  de las integrinas y la activación de FAK regula la fagocitosis de las bacterias (Metheniti, Paraskevopoulou et al. 2001; Mamali, Lamprou et al. 2009). En mamíferos se demostró que la activación de FAK es esencial en la fagocitosis de los fotorreceptores por el epitelio pigmentario retinal de la rata (Finnemann 2003), y en líneas celulares de leucocitos humanos la integrina  $\beta 1$  ha sido identificada como un receptor de adherencia a células apoptóticas (Schwartz, Karsan et al. 1999).

No obstante, la participación de FAK en el proceso de muerte celular del tejido interdigital no ha sido evaluada.



**Figura 7.** Vías de señalización de las integrinas mediadas por FAK. Ante la activación de FAK, la unión de proteínas adaptadoras con actividad cinasa inician vías de señalización que promueven supervivencia, proliferación y motilidad celular entre otras. Las flechas sólidas indican vías conocidas y las flechas puntuadas indican una posible interacción. Adaptado de (Guan 2010)

## 1. Planteamiento del Problema

La muerte del tejido interdigital es un proceso complejo que ha sido ampliamente estudiado. Se conoce la participación de diversos factores de crecimiento que interactúan para regular la regresión del interdígito por apoptosis. Asimismo, recientemente se ha descrito la importancia de las señales de la matriz extracelular en este proceso, por ejemplo, el corte del proteoglicano versicano genera un fragmento bioactivo que induce apoptosis en el interdígito (McCulloch, Nelson et al. 2009). Por otro lado, el proceso de fagocitosis de las células apoptóticas que se da a la par del proceso de apoptosis es crucial para mantener la homeostasis del tejido y la correcta regresión del interdígito.

Las integrinas son una familia de receptores de membrana evolutivamente conservados que juegan papeles importantes durante el desarrollo embrionario, regulando la comunicación entre las células y su matriz extracelular, así como la comunicación entre células. La señalización de las integrinas a través de la Cinasa de Adhesión Focal, regula diversos procesos celulares como la diferenciación, sobrevivencia, proliferación y migración. Participando así, en procesos tan diversos en el desarrollo embrionario como la formación de la cavidad proamniótica (Coucovanis and Martin 1995), la migración de las neuronas hacia la corteza cerebral (Marchetti, Escuin et al. 2010), la angiogénesis y vasculogénesis (Stupack and Cheresch 2004). Sin embargo, actualmente se desconoce el papel de las integrinas y su señalización a través de FAK en el proceso de muerte celular del tejido interdigital. La estrecha relación de las integrinas con la MEC nos lleva a intuir una relación entre las integrinas y los procesos de remodelación que se llevan a cabo durante el desarrollo de la extremidad. Además, se ha demostrado que las integrinas median la fagocitosis de células apoptóticas en *C. elegans* (Hsu and Wu 2010) y en otros modelos de mamíferos (Finnemann 2003), lo cual sugiere la participación de las integrinas en la fagocitosis de las células apoptóticas del tejido interdigital.

En el laboratorio se ha observado que la aplicación del anticuerpo neutralizante de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  disminuye la tinción de muerte en el tejido interdigital de la extremidad embrionaria del ratón. Por esta razón decidimos explorar el efecto de inhibir la señalización de la integrinas en general usando un inhibidor de FAK, y evaluando diversos aspectos del proceso de muerte en los que las integrinas podrían estar participando, como la regulación de expresión la expresión genética, la composición de la matriz extracelular y la fagocitosis de las células apoptóticas.



### **3. Hipótesis**

La señalización de las integrinas a través de FAK participa en el proceso de muerte del tejido interdigital del ratón, ya sea regulando la expresión de genes importantes en el proceso, la composición de la matriz extracelular o la fagocitosis de las células apoptóticas.

### **4. Objetivo General**

Elucidar en qué etapa del proceso muerte celular del tejido interdigital del ratón participa la señalización de las integrinas mediada por FAK.

#### **4.1 Objetivos Particulares**

- Evaluar el efecto sobre la muerte del tejido interdigital, de inhibir la señalización de las integrinas utilizando un inhibidor específico de FAK, sólo y en combinación con otros factores de crecimiento importantes en este proceso.
- Evaluar si la expresión de los genes BMP4 y BMP7 se ve afectada en los autópodos tratados con el inhibidor de FAK.
- Evaluar si la expresión del fragmento bioactivo del versicano se ve afectada con el tratamiento del inhibidor de FAK.
- Analizar si la fagocitosis se ve afectada al inhibir la señalización de FAK.

## 5. Materiales y Métodos

### *Anticuerpos, inhibidores y proteínas*

Para bloquear la cadena  $\alpha$  de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se utilizó el anticuerpo neutralizante CD49e anti-ratón purificado de hámster (BD Pharmigen #Cat: 553350). El anticuerpo neutralizante de  $\beta 1$  es de Santa Cruz Biotechnology (#Cat: SC-9936; California, EUA). Para inmunocitoquímica se utilizó el anticuerpo contra la caspasa-3 activa de Abcam (#Cat: ab-2302; CTR Scientific, Monterrey, México) y el anticuerpo contra la región DPEAAE del versicano de Thermo Scientific (#Cat: PA1-1748A; Illinois, EUA). El Kit de TUNEL para identificar apoptosis es de Invitrogen (#Cat: G3250; Wisconsin, EUA).

El inhibidor de FAK (PF573228) es de Tocris Bioscience (#Cat: 3239; Bristol, UK), el péptido RGD es de Invitrogen (#Cat: G-111803; California, EUA), el Ácido Retinoico de Tocris Bioscience (#Cat: 0695) y BMP7 de PreproTech (#Cat: 120-03; New Jersey, EUA).

### *Cultivo organotípico*

Ratones gestantes de la cepa CD-1 se sacrificaron al día 12.5 de gestación, que corresponde a la etapa embrionaria cuando empieza la muerte celular del interdígito. Los embriones se extraen y se disecan las extremidades posteriores y anteriores. Las patas se colocan sobre una membrana de policarbonato con poros de 1  $\mu\text{m}$  (Whatman #Cat: 110410) en medio de cultivo BGJb (GibcoInvotrgen #Cat: 12591038) con 1% de suero al que se le agregan los fármacos con las siguientes concentraciones dependiendo de las condiciones experimentales a evaluar: anticuerpo neutralizante de la cadena  $\alpha$  de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , 0.5mg/ml; anticuerpo neutralizante de la cadena  $\beta 1$  de la integrinas, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; RGD, 20 mg/ml; Inhibidor de FAK, 25-50 $\mu\text{M}$ ; Ácido Retinoico, 10 $\mu\text{M}$ ; y BMP7, 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Como control se le agregó a los cultivos DMSO (Sigma, #Cat: D2650; Ayrshire, UK), que es el vehículo en el cual se diluyen los inhibidores, en la misma cantidad

que en los tratados. Los cultivos se incuban durante 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y finalmente las extremidades son procesadas para analizar los cambios en la muerte celular del interdígito, en la expresión de genes o de proteínas. Este tipo de cultivos han sido usados para estudiar el desarrollo tanto de la extremidad como de otras estructuras como las gónadas, y se ha demostrado que el cultivo sobrevive en buenas condiciones hasta por 3-5 días (Lussier, Canoun et al. 1993).

#### *Tinción con Lysotracker y tinción de esqueleto*

El Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen, #Cat: L-7528) es una sonda fluorescente compuesta de una base débil aminada que permea libremente en la célula y se integra a los organelos ácidos de la célula. A nivel de tejido sirve para identificar de manera indirecta la apoptosis ya que se une a los fagolisosomas que se forman cuando los fagocitos los engullen.

Los autópodos se cultivan durante 40 min a 37°C en una solución 5µM de Lysotracker (LT) diluida en amortiguador de fosfatos salinos pH 7.4 (PBS), posteriormente se fijan en paraformaldehído (PFA) al 4% de 2 a 12 horas y se deshidratan en concentraciones graduales de metanol/PBT (PBS+Tween 0.1%) al 25, 50, 75 y 100%. Finalmente se transparentan con alcohol benzílico/benzil benzoato y se visualizan bajo radiación fluorescente con el filtro de  $\lambda=540\text{nm}$  en el microscopio emitiendo en el espectro del rojo ( $\lambda=500-600\text{nm}$ ).

Para visualizar el esqueleto, los autópodos se deshidratan con etanol 96%, después se añade acetona para permeabilizar el tejido, disolver las grasas y solidificar el esqueleto y finalmente se tiñen con Azul Alciano 0.3% y Alizarina Roja 0.1% que tiñe el cartílago de azul y el hueso de rojo, los autópodos se lavan después con la solución aclaradora para poder visualizar el esqueleto.

### *Hibridación in situ*

La hibridación in situ es un método ampliamente utilizado para observar el patrón de expresión de algún gen durante el desarrollo. El principio básico de esta técnica consiste en desarrollar una sonda marcada con algún fluorocromo o antígeno que sea identificado por un anticuerpo conjugado con un reactivo que desarrolle una reacción colorimétrica (como digoxigenina acoplada a fosfatasa alcalina), esta sonda debe de ser una hebra de RNA que contenga la secuencia complementaria de algún fragmento del RNA mensajero a identificar.

El protocolo se divide en varios pasos que se realizan en tres días. Las condiciones de algunos pasos varían según la sonda y el organismo en el que se realiza la hibridación. En este caso, se utilizaron los autópodos cultivados 12 horas con el inhibidor de FAK y en condiciones control (DMSO), se fijaron con PFA 4% durante 12 horas y se deshidrataron con series graduales de Metanol en PBT para su almacenaje en -20°C. Las sondas que se utilizaron están marcadas con digoxigenina. Brevemente, el protocolo de hibridación *in situ* que se utilizó fue el siguiente:

#### Día 1

##### - Rehidratación y permeabilización

Los autópodos deshidratados almacenados a -20°C se vuelven a hidratar con la serie inversa de Metanol/PBT (100, 75, 50 y 25%) y se permeabiliza el tejido con peróxido de hidrógeno al 6%/PBT en la oscuridad durante 1 hora y después con proteinasa K, la concentración y tiempo de incubación varía para cada sonda y organismo. Para las sondas utilizadas las condiciones de incubación con la proteinasa K fueron : 10µg/ml durante 25 minutos a 25°C.

Después de este periodo, los autópodos se vuelven a fijar con PFA 4% y Glutaraldehído 0.2% durante 20 min. Entre cada paso se realizan lavados cortos con PBT.

#### - Prehibridación

Se preparan los autópodos para la hibridación sumergiéndolos en Amortiguador de Hibridación (Formamida 50%, SSC 5x, SDS 1%, RNAt 50µg/ml, Heparina 50µg/ml) durante 3 horas a 65°C. La temperatura alta induce la desnaturalización del RNAy la formamida del amortiguador de hibridación estabiliza las cadenas simples del RNA desionizándolo.

#### - Hibridación

Se desnaturaliza la sonda en amortiguador de hibridación incubándola 2 minutos a 95°C y se agrega a los autópodos dejándolos sumergidos es esta solución toda la noche a 65°C.

### Día 2

#### - Lavados posthibridación

Los autópodos se lavan sumergiéndolos en la Solución I (50% formamida, 5x SSC (amortiguador de sodio citrato), 1% SDS, pH 5.1), dos veces 1 hora. En solución II (0.5 MNaCl, 10mM Tris-HCl, 0.1% Tween, pH 7.5) dos veces 30 minutos y en la Solución III (50% formamida, 2x SSC, pH 5) dos veces 30 minutos. Esto se realiza a 65°C. Después, se lavan 3 veces durante 10 minutos con TBST+2mM de levamisol a temperatura ambiente. El levamisol inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina endógena que puede interferir con la señal de hibridación.

#### - Bloqueo e incubación con el anticuerpo

Los autópodos se colocan en una solución de PBT con 10% de suero de chivo durante 2-3 horas en movimiento horizontal. Después, se incuban toda la noche a 4°C en una solución 1:2000 con el anti-DIG de Roche (anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina)en 10% de suero de chivo.

### Día 3

#### - Lavados postanticuerpo

Para quitar el exceso de anticuerpo y que la tinción salga limpia se realizan dos lavados de 5 minutos con TBST (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, KCl 10mM, Triton 1%, Levamisol 2mM, pH 7.4) y 15 lavados de 10 minutos en agitación horizontal a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan dos veces en NTMT (Tris-HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, NaCl 20mM, Tween 1%, Levamisol 1mM) durante 15 minutos.

#### - Reacción colorimétrica

La reacción colorimétrica se revela incubando los autópodos en la oscuridad con BM Purple (Roche) que es el sustrato de la fosfatasa alcalina que desarrolla una tinción permanente de color morado oscuro en el sitio donde se expresa el gen sondeado.

### *Inmunohistoquímica*

La inmunohistoquímica se utiliza para visualizar la expresión de proteínas de interés en los tejidos, utilizando anticuerpos que se unen específicamente a estas proteínas. Generalmente se utiliza un anticuerpo primario que se une de manera específica a la proteína de interés, y luego un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y que está marcado con un fluorocromo o con alguna enzima cromogénica. El método de detección también puede ser directo utilizando anticuerpos primarios marcados. En este caso se utilizaron los anticuerpos primarios mencionados en la primera sección: anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa de Abcam hecho en conejo en una dilución 1:125 y anticuerpo policlonal anti-DPEAAE de Thermo Scientific hecho en conejo en una dilución 1:100. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo conjugado con un fluorocromo Alexa Fluor 488 de Invitrogen en una

dilución 1:200. Para teñir los núcleos se utilizó DAPI(4,6-diamidino-2-fenilindol-dilactato) de Invitrogen en una concentración de 1µg/ml.

Para que el anticuerpo pueda permear bien y la tinción sea más precisa, los autópodos fueron embebidos en parafina, cortados en rebanadas de 6 µm en un micrótopo manual de Leica (RM2235) y colocadas en laminillas de vidrio tratadas con TESPA (3-aminopropiltriethoxisilano) para fijar el tejido a la laminilla.

Brevemente el protocolo se divide en los siguientes pasos:

- Desparafinación

Los cortes se desparafinan sumergiéndolos en xilol y concentraciones decrecientes de etanol, 5 minutos en cada una a temperatura ambiente.

- Bloqueo e incubación con anticuerpo primario

Las laminillas se incuban en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente en una solución de bloqueo con 1% albúmina+0.3%Tritón en PBS. Después de ese periodo se incuba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo toda la noche en la cámara húmeda.

- Incubación con anticuerpo secundario

Se lavan las laminillas 3 veces con PBS + Tritón 0.3% por 5 minutos y se incuban con el segundo anticuerpo durante 2 horas en cámara húmeda en la oscuridad.

- Montaje

Las laminillas se lavan con PBS 5 minutos y se sumergen en DAPI (1µg/ml) 10 minutos, posteriormente se vuelven a lavar con PBS y se coloca medio de montaje fluorescente de Dako

colocando encima un cubreobjetos y sellándolo con barniz transparente. Finalmente se visualizan en el microscopio de fluorescencia.

### *Microscopía*

Todos los experimentos fueron observados y fotografiados en el microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 acoplado a una cámara Axio Cam MRc, y a una lámpara de epi-fluorescencia P-FLA de Nikon, bajo el programa Axio Vision (Carl Zeiss). Las tinciones de inmunohistoquímica se visualizaron en un microscopio confocal Olympus America Inc. BX51WI acoplado a una unidad de disco giratorio (DSU).



## 6. Resultados

### 6.1 La integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la muerte del tejido interdigital del ratón de manera independiente de RGD

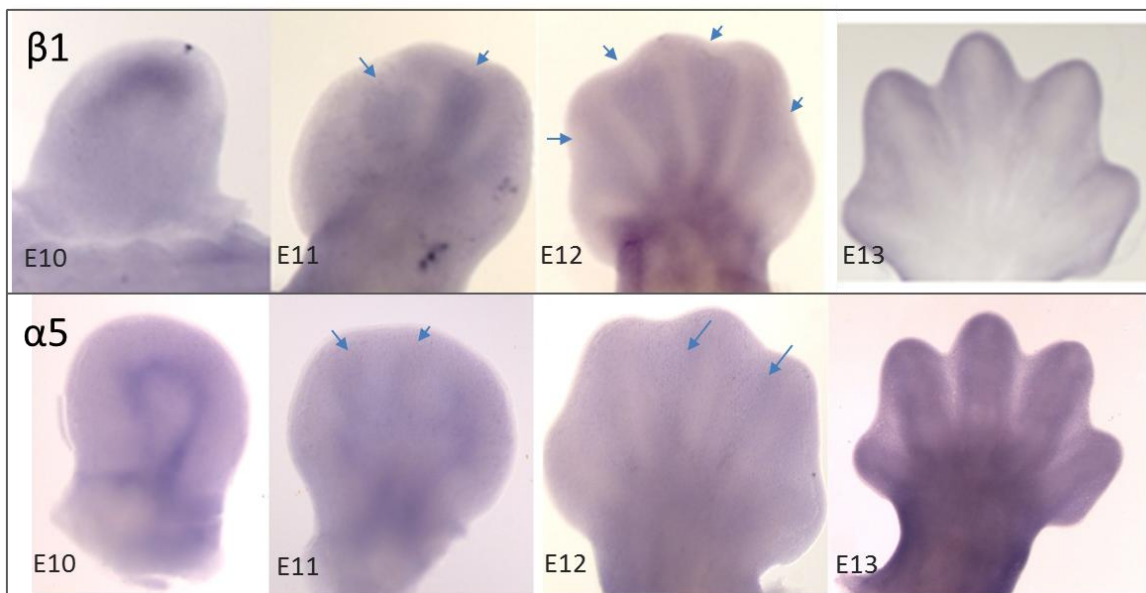
Resultados previos del laboratorio (no publicados) muestran la expresión de la integrina  $\beta 1$  en el autópodo del ratón en desarrollo (figura 8 panel superior). De manera interesante, la integrina  $\beta 1$  se expresa en el tejido interdigital desde la etapa donde los dedos y el interdígito se están prefigurando (E11), y justo antes de la etapa cuando comienza su regresión (E12). Entre otras integrinas, la integrina  $\alpha 5$  también muestra una localización en el interdígito durante estas etapas (figura 8 panel inferior).

La expresión tan marcada de la integrina  $\beta 1$  en el tejido interdigital nos llevó a explorar la participación de esta integrina sobre la muerte celular del tejido interdigital evaluada con la tinción con Lysotraker. Para esto se utilizó el anticuerpo neutralizante de la cadena  $\beta 1$  de las integrinas (0.2mg/ml), el cual bloquea su capacidad de ligación y activación, en cultivo organotípico de autópodos de E12.5 durante 24 horas. Los resultados muestran una notable disminución en la muerte celular comparado con el control (figura 9).

La integrina  $\alpha 5$  forma dímeros únicamente con  $\beta 1$ . Dado que su expresión también está presente en el interdígito, quisimos evaluar el papel de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre la regresión del interdígito. Se utilizó el anticuerpo neutralizante de la cadena  $\alpha 5$  en una concentración de 0.5mg/ml, obteniendo como resultado una disminución en la muerte celular comparable con la obtenida cuando se aplicó el anticuerpo neutralizante de  $\beta 1$  (figura 9).

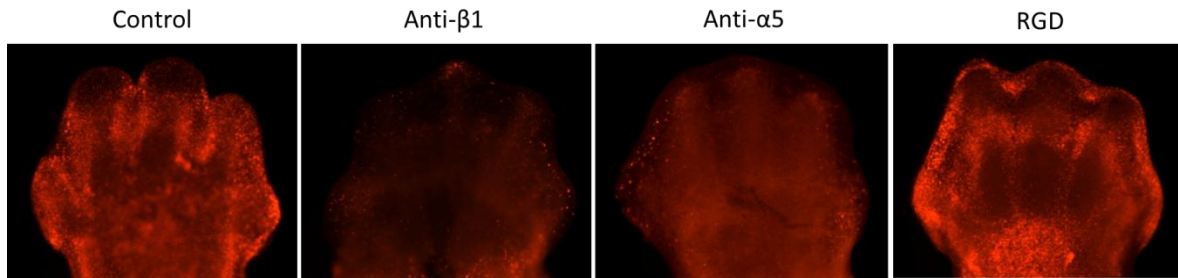
La fibronectina es la principal proteína de la MEC que se localiza en el tejido interdigital, la integrina  $\alpha 5\beta 1$  reconoce a la fibronectina u otras proteínas de la MEC a través de su secuencia RGD, sin embargo, existen otras integrinas que reconocen fibronectina como la  $\alpha v$  y  $\alpha 8$ . Para

evaluar si el efecto observado con el tratamiento del anticuerpo neutralizante de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  es dependiente de la unión a ligandos con secuencia RGD y exclusivo de este dímero, se bloqueó la activación de estas integrinas utilizando el péptido RGD (20 mg/ml) que, cuando se coloca de manera soluble en el medio, bloquea la unión de las integrinas a ligandos con secuencia RGD impidiendo su activación y señalización (Schwartz 1993). Sorprendentemente, el péptido RGD produjo una franja más ancha de muerte en todos los autópodos tratados (figura 9). Esto nos indica que las integrinas que reconocen ligandos con secuencia RGD en general no participan en la regulación de este proceso y que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  lo hace de manera independiente a RGD, además nos abre la posibilidad de que otras integrinas en combinación con  $\beta 1$  estén involucradas en este proceso, ya que el bloqueo de la cadena  $\beta 1$ , la cual se puede unir con otras integrinas  $\alpha$ , produce una disminución en la muerte del tejido interdigital.



**Figura 8.** Hibridación in situ que muestra el patrón de expresión de la integrina  $\beta 1$  (panel superior) y de la integrina  $\alpha 5$  (panel inferior) en la extremidad embrionaria del ratón desde el estadio 10 hasta el 13. Ambos genes localizan en el interdígito (flechas azules) en la etapa donde el dedo y el

interdígito se están prefigurando (E11) y en la etapa donde inicia la muerte del tejido interdigital (E12)



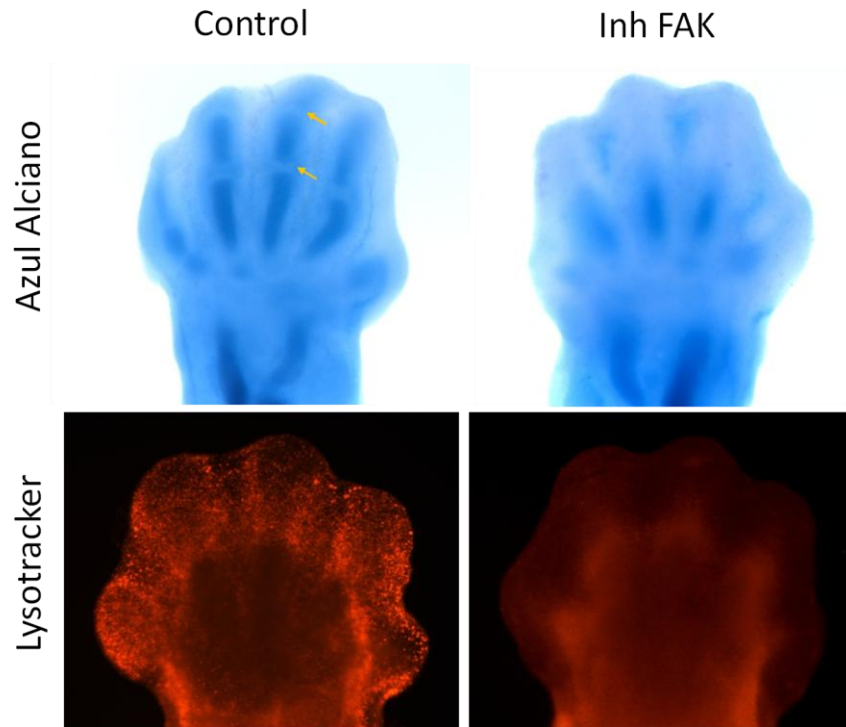
**Figura 9.**Tinción con LysoTracker que revela la muerte celular en el autópodo de ratón cultivado bajo condiciones control, con el anticuerpo neutralizante de  $\beta 1$  y de  $\alpha 5$  y con el péptido RGD. Se muestra una disminución en la muerte celular del interdígito en los autópodos tratados con el bloqueador de la cadena  $\beta 1$  de la integrina así como cuando se bloquea la cadena  $\alpha$  de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . En contraste, se muestra una línea mas ancha de muerte en el tratado con el péptido RGD.

## 6.2 FAK participa en el control de la muerte celular del interdígito

A continuación, se quiso explorar el efecto de inhibir la señalización de las integrinas en general utilizando PF573228, un inhibidor específico de FAK. Este inhibidor impide la fosforilación de FAK en la tirosina 397 y su efectividad ha sido comprobada en cultivos celulares(Slack-Davis, Martin et al. 2007).

Para comprobar que el fármaco funciona en nuestro modelo, se evaluó su efecto sobre la condrogénesis. Está reportado que FAK participa en la condensación de los condrocitos y que su inhibición retrasa este proceso (Bang, Kim et al. 2000). El tratamiento con  $30\mu\text{M}$  de PF573228 demostró que el fármaco funciona ya que, mientras que en el control, los dígitos están formados hasta la segunda falange en concordancia con su estadio de desarrollo, en los tratados su formación se detuvo en la primera falange (Figura 10 Azul Alciano).

Por otro lado, los resultados muestran una inhibición de la muerte celular con el tratamiento con PF573228 (figura 10 Lysotracker), lo cual comprueba la participación de FAK en este proceso.

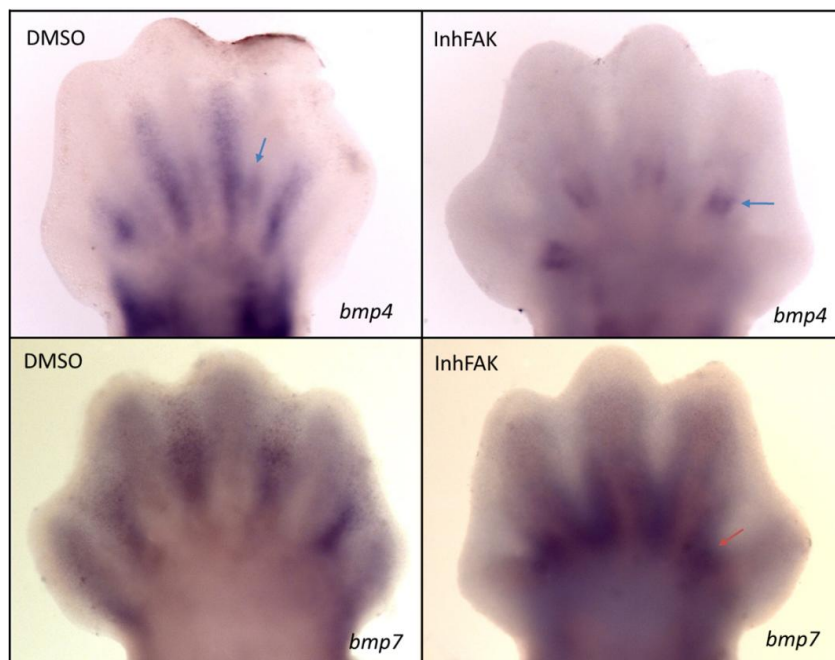


**Figura 10.** Tinción de esqueleto (Azul Alciano) y muerte celular (Lysotracker) de autópodos cultivados en condiciones control y con el inhibidor de FAK. Se muestra una inhibición de muerte y un retraso en la formación de los dígitos en los autópodos tratados con PF573228, las flechas amarillas indican el lugar de las falanges.

### 6.3 FAK regula la expresión de *bmp4* y *bmp7*

Dado que FAK medía la señalización de diferentes vías que influyen en la transcripción genética, quisimos evaluar si la inhibición de esta señalización tenía consecuencias en el patrón de expresión de los genes que están presentes durante la etapa de muerte celular del interdígito. Para esto, se realizó hibridación in situ con los autópodos cultivados con el inhibidor de FAK para los genes

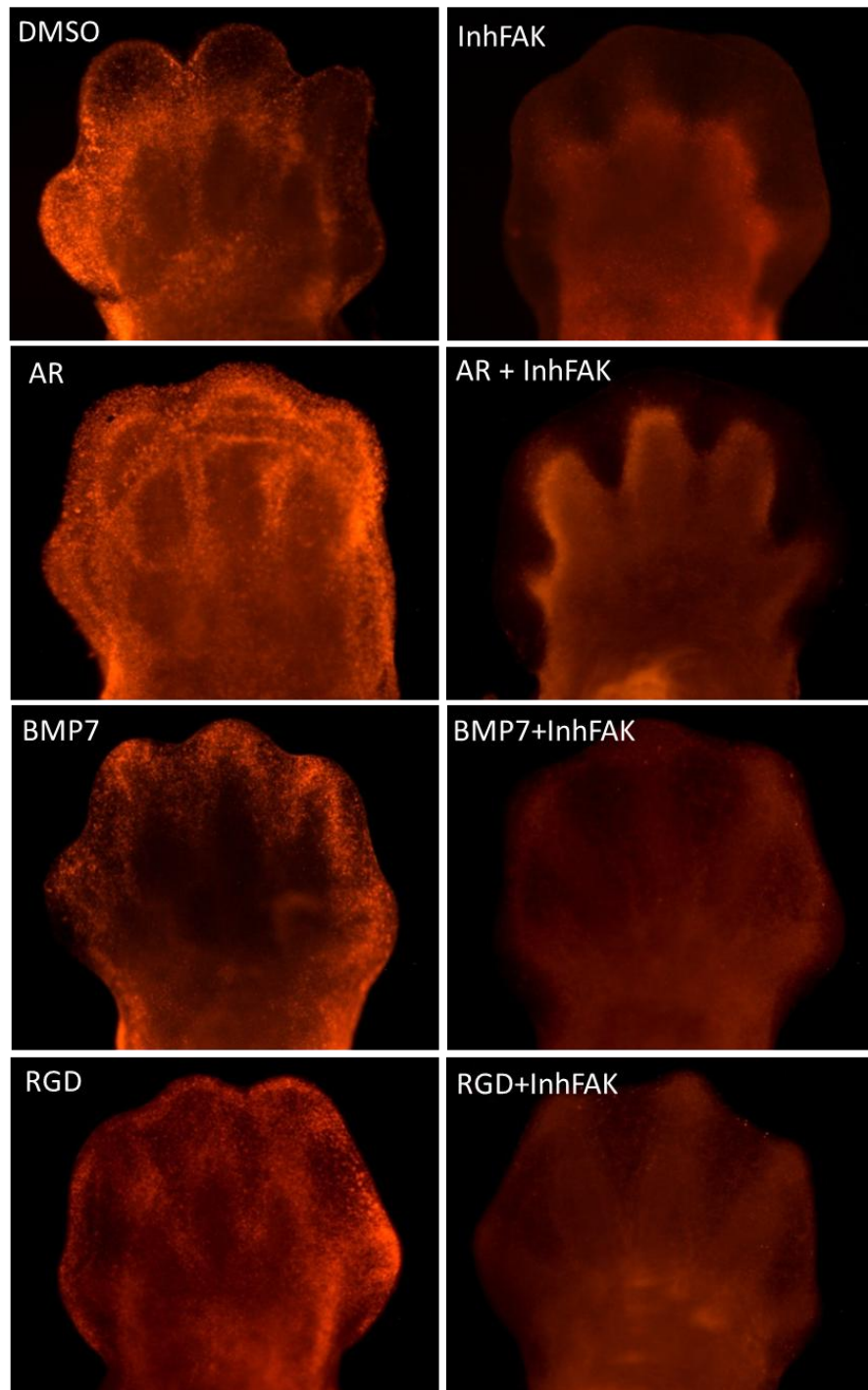
*bmp7* y *bmp4*, que son unos de los principales genes presentes en el interdígito que regulan su regresión. Los resultados muestran que el tratamiento con PF573228 altera la expresión normal de estos genes. La expresión de *bmp4* desaparece del interdígito y permanece solamente en el blastema de los tendones, una pequeña región en la parte más proximal de los dedos (Figura 12 derecha-arriba). Mientras que la expresión de *bmp7* se relocaliza en el pericondrio (límite entre el dedo y el interdígito) y en la parte más proximal del interdígito (Figura 12 derecha-abajo). Estos resultados sugieren que FAK tiene influencia en la regulación de la transcripción de estos genes. Esta expresión alterada puede explicar los efectos de inhibición de muerte que se obtienen al inhibir FAK.



**Figura 12.** Hibridación *in situ* para los genes *bmp4* y *bmp7*. La expresión de ambos genes se ve afectada en los autópodos tratados con el inhibidor de FAK. Mientras que *bmp4* se localiza claramente en los interdígitos, en los autópodos tratados, la expresión se restringe a los blastemas de los tendones (flecha azul), *bmp7* que también se localiza en el interdígito en condiciones control, se expresa en los autópodos tratados en el pericondrio y en la parte más proximal del interdígito (flecha roja).

#### **6.4 FAK está río abajo de AR, BMP7 y RGD**

Nuestra siguiente aproximación consistió en agregar a los cultivos factores que promueven la muerte del interdígito, en presencia o ausencia del inhibidor de FAK, para evaluar la relación de estos factores con la señalización de FAK. El AR y BMP7 aceleran y aumentan la muerte del interdígito cuando se coloca en cultivo en las etapas donde comienza la muerte tanto en perlas colocadas en los interdígitos de pollo como en cultivos organotípicos del autópodo del ratón (Lussier, Canoun et al. 1993; Hernandez-Martinez, Castro-Obregon et al. 2009). Asimismo, el efecto inductor de muerte del péptido RGD visto en la figura 9 fue probado en combinación con PF573228. Notablemente, la presencia del inhibidor de FAK fue capaz de inhibir el efecto inductor de muerte de AR, BMP7 y RGD (Figura 13). Estos resultados sugieren que FAK está río abajo de AR, BMP y RGD. Esto se puede interpretar de dos maneras: 1) que la señalización de AR, BMP y RGD activa a FAK para mediar la muerte celular o 2) que FAK regula un proceso independiente o alternativo que culmina también en muerte celular y que opaca el efecto inductor de muerte de AR, BMP y RGD en este experimento. Dado que se ha demostrado que el control de muerte en el tejido interdigital es redundante consideramos explorar la segunda alternativa con los siguientes experimentos.

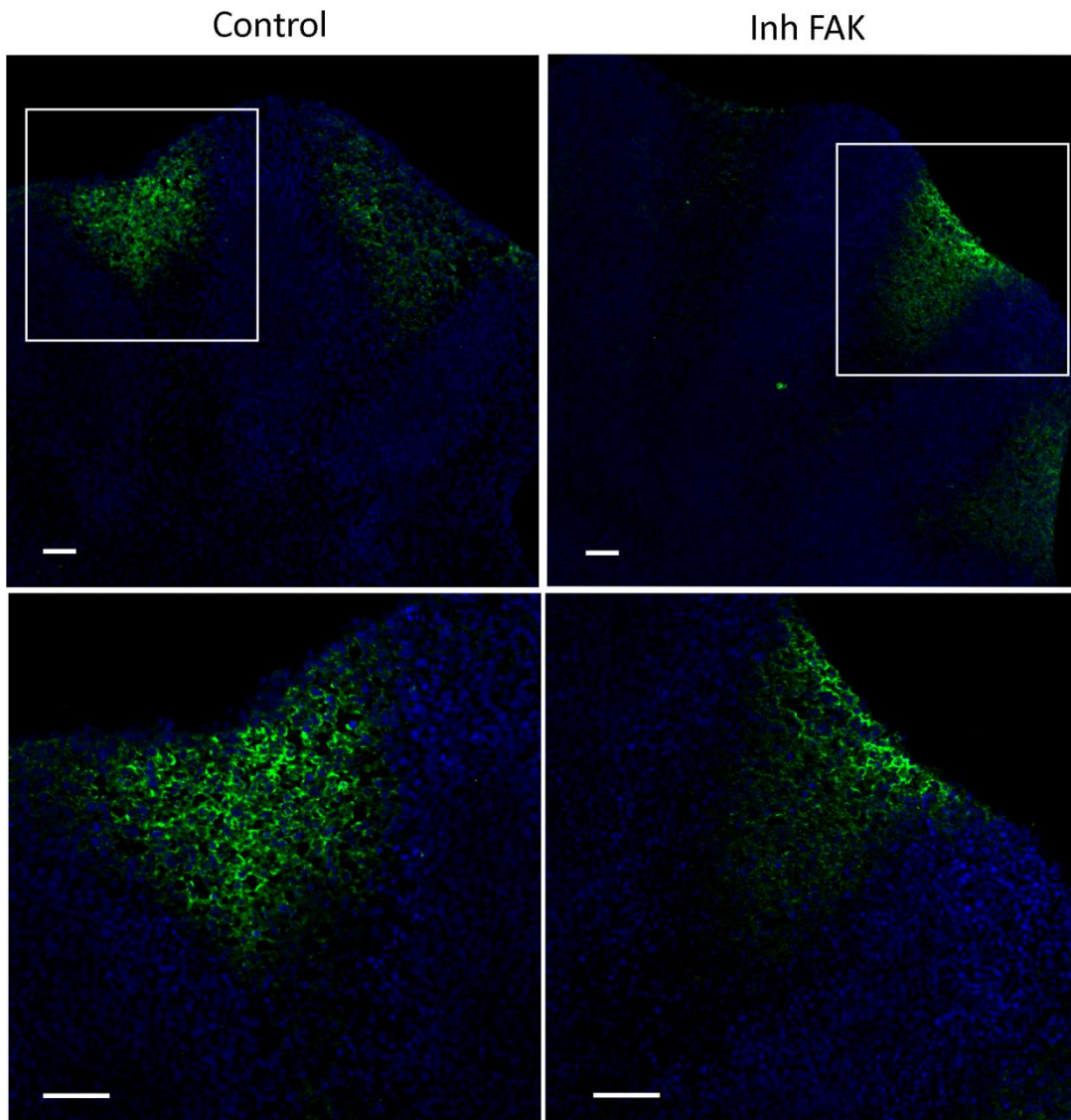


**Figura 13.** En la columna izquierda se muestra el autópodo control y los tratados con factores proapoptóticos AR, BMP7 y RGD, en la columna izquierda se muestran los autópodos cultivados con estos factores en combinación con el inhibidor de FAK donde se observa una notable disminución de la muerte teñida con LysoTracker.

## **6.5 La presencia del fragmento bioactivo del versicano (DPEAAE) no se altera cuando se inhibe la señalización de FAK**

Tomando en cuenta los resultados anteriores, y explorando la posibilidad de que la señalización de FAK regula un proceso independiente a AR y BMP, se evaluó la expresión del fragmento DPEAAE del versicano en condiciones control y en presencia del inhibidor de FAK, mediante inmunohistoquímica. Se ha demostrado que el proteoglicano versicano es cortado en el tejido interdigital durante el proceso de muerte celular, generando un fragmento compuesto por los aminoácidos DPEAAE el cual induce apoptosis, mientras que la inhibición de su corte genera sindactilia. (McCulloch, Nelson et al. 2009) Se ha reportado que el versicano se une con la integrina  $\beta 1$  y que esta unión activa FAK (Wu, Chen et al. 2002), por lo cual es posible que FAK este regulando su corte. Los resultados indican que el fragmento bioactivo de versicano está presente en el interdígito tanto en los autópodos control como en los tratados, lo cual indica que la señalización de FAK no regula directamente el corte de este proteoglicano (Figura 14).





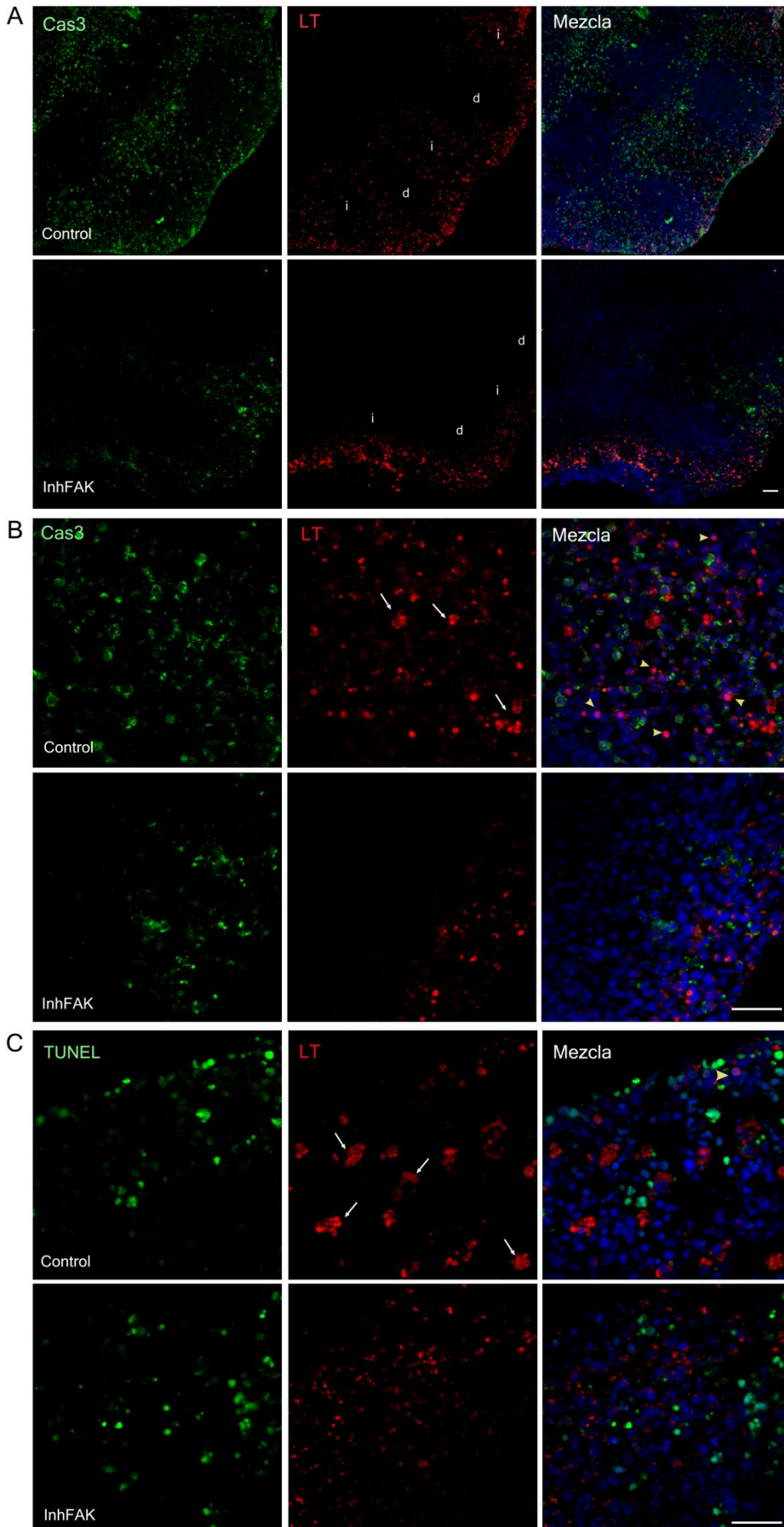
**Figura 14.** Expresión del fragmento DPEAAE del versicano el cual se localiza claramente en el interdígito en diferentes niveles tanto en autópodos cultivados bajo condiciones control como en los tratados con el inhibidor de FAK. Las figuras de abajo son un aumento del recuadro de la figura superior, las barras de escala indican 50  $\mu\text{m}$ .

## 6.6 La apoptosis está presente en los autópodos tratados con el inhibidor de FAK

Otro proceso independiente que FAK podría estar regulando es la fagocitosis de las células apoptóticas. Dado que la tinción de muerte con LysoTracker es una forma indirecta de identificar células apoptóticas, ya que se integra a los organelos ácidos como fagolisosomas que se forman cuando los fagocitos engullen a las células apoptóticas, quisimos comprobar que la disminución en la tinción con LysoTracker refleja una disminución en la apoptosis. Para esto, se hizo una tinción con Caspasa 3 activa y TUNEL en combinación con LysoTracker, en cortes de autópodos cultivados en condiciones control y con el inhibidor de FAK. Sorprendentemente, los resultados muestran que sí hay apoptosis en los autópodos tratados con el inhibidor de FAK (Figura 16 primera columna) lo cual nos indica que el tratamiento con el inhibidor de FAK no está previniendo la apoptosis per se. Por lo tanto, la disminución de la tinción con LysoTracker se puede interpretar como una disminución en la fagocitosis de las células apoptóticas. En cuanto a la tinción con LysoTracker, la microscopia confocal reveló dos diferencias significativas entre los autópodos control y los tratados con el inhibidor de FAK: 1) en la distribución y 2) en la morfología de los cuerpos teñidos. En el caso de los autópodos control, la distribución de los cuerpos teñidos con LysoTracker se encuentra dispersa por todo el interdígito, esta tinción se localiza alrededor de las células y frecuentemente colocaliza con el núcleo (Figura 16 Mezcla, flecha amarilla). En general la morfología de la tinción es de cuerpos circulares que se encuentran asociados a alguna célula o agregados en cúmulos independientes más grandes que las células (Fig.16 flechas blancas, columna central). En los autópodos tratados con el inhibidor de FAK, la tinción se localiza únicamente a lo largo del margen distal de la extremidad, en forma de numerosos cuerpos pequeños y asimétricos asociados a la célula alrededor del núcleo, sin ninguna forma consistente y nunca formando cúmulos ni colocalizando con el núcleo.

En el control, la fagocitosis se puede evidenciar con la colocalización de LysoTracker con el núcleo, mientras que los cúmulos de vesículas ácidas observadas pueden interpretarse como fagolisosomas ya que los fagocitos engullen varias células apoptóticas y esto se ve reflejado en el número de fagolisosomas que contiene. En las extremidades tratadas con el inhibidor de FAK, no se observan cúmulos de fagolisosomas y la colocalización de LysoTracker con el núcleo es mínima.

Estos resultados sugieren que la señalización de las integrinas a través de FAK está regulando la fagocitosis de las células apoptóticas. Sin embargo, se requieren más experimentos para confirmar esta teoría.



**Figura 16.** Inmunofluorescencia contra caspasa 3 activa (A yB), tinción de TUNEL (C) y tinción de LysoTracker (columna central) en cortes de autópodos control y tratados con el inhibidor de FAK. A)La tinción de caspasa 3 activa (primera columna) nos muestra una menor tinción en los autópodos tratados con el inhibidor de FAK comparado con el control; la tinción de LysoTracker nos muestra un patrón de expresión diferente en los autópodos tratados, mientras que en el control se localiza tanto en la parte distal de la extremidad como en los interdógitos, en los tratados se localiza únicamente en la parte distal. B y C) Acercamientos en los que se aprecia la tinción de caspasa3 activa en el citoplasma (B) y en el núcleo TUNEL (C), la tinción de TUNEL es similar tanto en los autópodos control como en los tratados. En la tinción de LysoTracker se aprecia cúmulos de vacuolas fagocíticas en el control (flechas blancas) y colocalización de éste en el núcleo (flechas amarillas tercera columna). En los tratamientos no se observan estas estructuras, y la tinción esta alrededor del núcleo en forma punteada. Abreviaciones: d-dedo, i-interdígito, Cas3-caspasa3 activa. Línea de escala: 50µm.

## 7. Discusión

En esta tesis se evaluó el papel de la señalización de las integrinas a través de FAK en la muerte del tejido interdigital del ratón. Los resultados presentados sugieren la participación FAK en este proceso, especialmente en las etapas tardías de la apoptosis donde se involucra la eliminación de las células apoptóticas por los fagocitos.

### 7.1 Las integrinas regulan la muerte celular del tejido interdigital a través de la señalización de FAK

El patrón de expresión de la integrina  $\beta 1$  y  $\alpha 5$  nos muestra que estas integrinas están presentes en el tejido interdigital justo antes de que comience su regresión. Esto es interesante ya que su expresión durante el desarrollo del autópodo no se había analizado antes. La presencia de estos genes en esta etapa del desarrollo de la extremidad nos sugiere que estas integrinas están participando en el control de la muerte del tejido interdigital. Para demostrar esto decidimos bloquear la activación de éstas integrinas utilizando anticuerpos neutralizantes de la cadena  $\beta$  y  $\alpha$  y el péptido RGD. Estos anticuerpos y el péptido RGD, son los mismos utilizados previamente en el laboratorio, donde se demostró que su inyección en la zona de la muñeca en embriones de ratón induce la formación de una articulación ectópica. La formación de la articulación ectópica involucra la expresión de genes relacionados con este proceso como *Wnt14* y *Gdf5* además de la presencia de apoptosis. Estos resultados proponen que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  coordina la formación de las articulaciones de manera dependiente de RGD (Garcíadiego-Cazares, Rosales et al. 2004). En contraste con estos resultados, en la presente tesis el bloqueo de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  provocó una disminución de la muerte del tejido interdigital de manera independiente de RGD. Es decir, que la señalización de esta integrina, promueve la muerte del tejido interdigital de manera

independiente a su unión con fibronectina u otro ligando de MEC con secuencia RGD, ya que cuando se agregó el péptido RGD se observó un aumento de muerte en que contrasta con la disminución observada con el anticuerpo anti- $\beta 1$  y anti- $\alpha 5$ . Además, esto nos sugiere que la integrina  $\beta 1$  participa junto con otras integrinas  $\alpha$  que no reconocen fibronectina para regular la regresión del interdígito. El hecho de que RGD induzca muerte celular se puede deber a que hay otras integrinas que, mediante su unión a fibronectina, promuevan la sobrevivencia del tejido interdigital. De esta manera, la inhibición de la ligación de estas integrinas a ligandos de MEC con secuencia RGD pudo haber inducido muerte por *anoicis* (muerte por pérdida de adhesión a las integrinas).

Como siguiente experimento, se decidió evaluar la participación de FAK en el proceso de muerte del tejido interdigital utilizando un inhibidor específico de esta cinasa. Como resultado se obtuvo una casi completa inhibición en la muerte celular, mucho más marcada que cuando se bloqueó la integrina  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  (figura 10). Esto nos indica que la señalización de las integrinas –además de la  $\alpha 5$  y  $\beta 1$ - a través de FAK participa en la regulación de este proceso.

El bloqueo de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  y de FAK durante el desarrollo embrionario ha dado diversos resultados. Por ejemplo, la inhibición de  $\alpha 5\beta 1$  produce defectos en la remodelación de la vasculatura (van der Flier, Badu-Nkansah et al. 2010), en la migración de las neuronas corticales (Marchetti, Escuin et al. 2010) y muerte de los condrocitos (Pulai, Del Carlo et al. 2002) mientras que la inhibición de FAK produce defectos en la vasculogénesis (Lim, Chen et al. 2010) e inhibe la condensación de los condrocitos (Bang, Kim et al. 2000). Sin embargo, no se ha reportado su actividad induciendo procesos de muerte celular; los primeros resultados presentados en esta tesis (figura 9 y 10) proponen por primera vez que la señalización de las integrinas puede promover la muerte celular, esto resulta controversial con la conocida función de sobrevivencia de las integrinas, no obstante, existe la posibilidad de que las integrinas estén regulando

positivamente la expresión de genes que estimulan el inicio de la muerte en ese momento del desarrollo. Por lo anterior se planteó explorar si dentro de los genes blanco de la señalización de las integrinas, están los genes de la familia de las BMPs. Las BMP regulan positivamente la regresión del interdígito y su falta de expresión provoca sindactilias. Las hibridaciones *in situ* para los genes *bmp4* y *bmp7* revelaron que su expresión está alterada en los autópodos que fueron tratados con el inhibidor de FAK (Figura 11). Mientras que *bmp4* se expresa en el interdígito y en los blastemas del tendón, en los autópodos tratados, la expresión en el interdígito desaparece por completo y permanece únicamente en los blastemas del tendón, los cuáles se ven más acortados probablemente resultado del atraso en la condensación condrocítica. En el caso de la expresión de *bmp7*, su expresión se redistribuye hacia la parte más proximal del interdígito y al pericondrio. Estos resultados sugieren que la señalización de las integrinas a través de FAK contribuye en la activación de la expresión de los genes *bmp4* y *bmp7*.

## **7.2 La actividad de FAK es independiente de los factores proapoptóticos y no altera la expresión del fragmento bioactivo del versicano**

Para dilucidar si la activación de FAK está *rio arriba* o *rio abajo* de la señalización de AR y BMP7 durante la inducción de la muerte celular se uso el inhibidor de FAK en combinación con estos factores. También se probó en combinación con el péptido RGD que, como se vio en la figura 9, tiene un efecto inductor de muerte. En todos los casos, el inhibidor de FAK inhibió la inducción de muerte de estos factores (Figura 13). Esto sugiere que la activación de FAK es un paso necesario que sucede *rio abajo* de estos factores o que la activación de FAK regula un proceso alterno de muerte celular y que opaca el efecto inductor de muerte de AR, BMP y RGD.

Se ha demostrado que el control de muerte en el tejido interdigital es redundante, y que varias vías participan para regular este proceso como las caspasas, las catepsinas de los lisosomas (Zuzarte-Luis, Montero et al. 2007), las DNAsas (Montero, Lorda-Diez et al. 2010) y los fragmentos bioactivos de la matriz extracelular (McCulloch, Nelson et al. 2009). Dado que las integrinas están en íntimo contacto con la MEC, se quiso explorar si su señalización regula el corte del fragmento bioactivo del versicano (DPEEAE) el cual induce la muerte del tejido interdigital, sin embargo los resultados indican que la señalización de las integrinas no tiene un efecto directo sobre la regulación del corte del versicano. No obstante, este resultado no descarta la posibilidad de que el fragmento bioactivo del versicano esté interactuando con la integrina para inducir la regresión del interdígito.

### **7.3 FAK participa en la regulación de la fagocitosis de las células apoptóticas**

Otro proceso posterior e independiente en el cual las integrinas pudieran estar participando es en la fagocitosis de las células apoptóticas. Para evaluar esto, fue necesario diferenciar las células apoptóticas del proceso de fagocitosis evidenciado por Lysotracker.

La tinción de TUNEL y Caspasa-3 activa reconocen específicamente células apoptóticas. Estas tinciones se hicieron en combinación con Lysotracker. Se pudo observar que la apoptosis está presente en el interdígito, tanto en los autópodos control como en los tratados con el inhibidor de FAK, aunque en estos últimos se nota una ligera disminución en la tinción sobretodo en la tinción con caspasa 3 activa (Figura 16A-B). La presencia de apoptosis en los autópodos tratados parece contradictoria con los resultados de la expresión de *bmp4* y *bmp7* presentados arriba, en donde la expresión de estos genes se ve alterada en el tratamiento con el inhibidor de FAK. Sin embargo, se ha demostrado en ratones mutantes deficientes de BMP2, BMP4 o BMP7, que la deficiencia de



BMP2 provoca sindactilia del tejido blando y que ésta se acentúa en combinación con BMP4, no obstante, la deficiencia sola de BMP4 o BMP7 no produce este fenotipo (Bandyopadhyay, Tsuji et al. 2006). La presencia de la expresión normal de *bmp2*, no evaluada en el presente trabajo, podría explicar la presencia de apoptosis, además de otros mecanismos que promueven apoptosis que han demostrado ser independientes de BMP (McCulloch, Nelson et al. 2009). No obstante, la disminución en la tinción de caspasa 3 activa, marcador temprano de apoptosis, puede deberse a esta expresión alterada de *bmp 4 y 7*.

Por otra parte, la tinción con Lyotraker reveló la presencia de fagolisosomas en los autópodos control, evidencia de que la fagocitosis se está llevando a cabo; mientras que en los tratados con el inhibidor de FAK no se observaron fagolisosomas y la tinción se limitó hacia la zona distal de la extremidad con una morfología diferente. Lyotracker, además de reconocer fagolisosomas también puede reconocer vacuolas autofágicas. La autofagia es una respuesta celular a la escases de nutrientes y otras situaciones de estrés. Es posible que la tinción que se observa en las extremidades tratadas con el inhibidor de FAK pueda representar autofagia ya que durante ésta, se forman numerosas vacuolas citoplasmicas en la región perinuclear (Levine and Yuan 2005) que se pueden apreciar claramente en la Figura 16 (Inh FAK) en forma de una tinción puntuada alrededor del núcleo. Probablemente, la región más distal de la extremidad es más susceptible a la falta de nutrientes durante el cultivo lo cual se refleja en la tinción observada en esa región. Además, la inhibición de FAK puede estar contribuyendo en la inducción de autofagia ya que en el control este fenómeno es mínimo. Sería interesante probar un marcador específico para autofagia y comprobar que esta tinción desaparece con el inhibidor de PI3K, con el cual la autofagia se inhibe (Backer 2008), para confirmar este resultado.

Para comprobar que FAK está regulando la fagocitosis se requiere una tinción específica de macrófagos. Cabe mencionar que en el ratón, el linaje de macrófagos -reconocible por el

anticuerpo F4/80- aparece alrededor del décimo día de gestación en el saco vitelino y el hígado, y luego se distribuyen por los tejidos mesenquimáticos de manera que a la mitad de la gestación (11 días) la mayoría de los tejidos tienen macrófagos residentes (Morris, Graham et al. 1991). En el caso del autótopo, las zonas donde se localizan los macrófagos correlacionan con la distribución de la muerte celular programada (Hopkinson-Woolley, Hughes et al. 1994). Por esta razón sería interesante evaluar la expresión de F4/80 en los autótopos tratados con el inhibidor de FAK y analizar el número de células apoptóticas fagocitadas que contienen, comparado con el control no tratado.

Recientemente se demostró que la integrina INA de *C. elegans* es esencial para mediar la fagocitosis de las células apoptóticas activando la vía ced-12, ced-2 y ced-5 de manera independiente de FAK (Hsu and Wu 2010). En insecto (Mamali, Lamprou et al. 2009) y en molusco (Plows, Cook et al. 2006), se ha visto que la fagocitosis resulta en la activación de FAK; y en líneas celulares murinas de monocitos y de células del epitelio retinal, se ha observado que la integrina  $\alpha\beta 5$  recluta la vía CrkII-Dock180-Rac1 (Albert, Kim et al. 2000) y activa FAK (Finnemann 2003), para mediar la fagocitosis. La función de FAK como mediador de la fagocitosis parece más evidente en modelos de mamíferos (ratón), estos datos están en concordancia con nuestros resultados. El presente trabajo es el primero que analiza la importancia de FAK en el proceso de fagocitosis de las células del interdígito durante el desarrollo de la extremidad del ratón.

## 8. Conclusión

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la actividad de FAK es importante en la fagocitosis de las células apoptóticas durante el desarrollo embrionario de la extremidad del ratón. La inhibición de FAK en nuestro modelo, altera la expresión de *bmp4* y *bmp7* en las células mesenquimáticas del interdígito, e inhiben la fagocitosis en los macrófagos residentes de la extremidad. Por otra parte, el presente trabajo constituye una llamada de atención para usar con reserva marcadores no específicos de apoptosis como LysoTracker, que puedan enmascarar otros resultados.

## 10. Referencias

- Akakura, S., S. Singh, et al. (2004). "The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells." Exp Cell Res **292**(2): 403-416.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, et al. (2002). "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." Genes Dev **16**(21): 2813-2828.
- Albert, M. L., J. I. Kim, et al. (2000). "alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells." Nat Cell Biol **2**(12): 899-905.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-430.
- Ashton, G. H., J. P. Morton, et al. (2010). "Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling." Dev Cell **19**(2): 259-269.
- Backer, J. M. (2008). "The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34." Biochem J **410**(1): 1-17.
- Bandyopadhyay, A., K. Tsuji, et al. (2006). "Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis." PLoS Genet **2**(12): e216.
- Bang, O. S., E. J. Kim, et al. (2000). "Association of focal adhesion kinase with fibronectin and paxillin is required for precartilagel condensation of chick mesenchymal cells." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 522-529.
- Bolos, V., J. M. Gasent, et al. (2010). "The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer." Onco Targets Ther **3**: 83-97.
- Brugnera, E., L. Haney, et al. (2002). "Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex." Nat Cell Biol **4**(8): 574-582.
- Coucouvanis, E. and G. R. Martin (1995). "Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo." Cell **83**(2): 279-287.
- Coultas, L. and A. Strasser (2003). "The role of the Bcl-2 protein family in cancer." Semin Cancer Biol **13**(2): 115-123.
- Chen, H., Y. Lun, et al. (1998). "Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome." Nat Genet **19**(1): 51-55.
- Cheresh, D. A. and D. G. Stupack (2002). "Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype?" Nat Med **8**(3): 193-194.
- Chimal-Monroy, J., M. T. Bravo-Ruiz, et al. (1996). "Regulation of chondrocyte differentiation by transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3, and beta 5." Ann N Y Acad Sci **785**: 241-244.
- Chimal-Monroy, J., J. Rodriguez-Leon, et al. (2003). "Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling." Dev Biol **257**(2): 292-301.
- Debeer, P., E. F. Schoenmakers, et al. (2002). "The fibulin-1 gene (FBLN1) is disrupted in a t(12;22) associated with a complex type of synpolydactyly." J Med Genet **39**(2): 98-104.
- Dessau, W., H. von der Mark, et al. (1980). "Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis." J Embryol Exp Morphol **57**: 51-60.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-252.
- Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, et al. (1998). "The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15394-15399.

- Dolle, P., E. Ruberte, et al. (1989). "Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse." Nature **342**(6250): 702-705.
- Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest **101**(4): 890-898.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.
- Fernandez-Teran, M. and M. A. Ros (2008). "The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways." Int J Dev Biol **52**(7): 857-871.
- Fernandez-Teran, M. A., J. R. Hinchliffe, et al. (2006). "Birth and death of cells in limb development: a mapping study." Dev Dyn **235**(9): 2521-2537.
- Finnemann, S. C. (2003). "Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors." EMBO J **22**(16): 4143-4154.
- Frantz, C., K. M. Stewart, et al. (2010). "The extracellular matrix at a glance." J Cell Sci **123**(Pt 24): 4195-4200.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4798-4811.
- Gaipl, U. S., S. Franz, et al. (2004). "Defects in the disposal of dying cells lead to autoimmunity." Curr Rheumatol Rep **6**(6): 401-407.
- Ganan, Y., D. Macias, et al. (1998). "Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of msx gene expression in the developing autopod." Dev Biol **196**(1): 33-41.
- Ganan, Y., D. Macias, et al. (1996). "Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod." Development **122**(8): 2349-2357.
- Garciadiego-Cazares, D., C. Rosales, et al. (2004). "Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton." Development **131**(19): 4735-4742.
- Geetha-Loganathan, P., S. Nimmagadda, et al. (2006). "Expression pattern of BMPs during chick limb development." Anat Embryol (Berl) **211 Suppl 1**: 87-93.
- Guan, J. L. (2010). "Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer." IUBMB Life **62**(4): 268-276.
- Gumienny, T. L., E. Brugnera, et al. (2001). "CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration." Cell **107**(1): 27-41.
- Healy, C., D. Uwanogho, et al. (1996). "Expression of the chicken Sox9 gene marks the onset of cartilage differentiation." Ann N Y Acad Sci **785**: 261-262.
- Henry-Mowatt, J., C. Dive, et al. (2004). "Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer." Oncogene **23**(16): 2850-2860.
- Hernandez-Martinez, R., S. Castro-Obregon, et al. (2009). "Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid." Development **136**(21): 3669-3678.
- Hopkinson-Woolley, J., D. Hughes, et al. (1994). "Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse." J Cell Sci **107 ( Pt 5)**: 1159-1167.

- Hsu, T. Y. and Y. C. Wu (2010). "Engulfment of apoptotic cells in *C. elegans* is mediated by integrin alpha/SRC signaling." Curr Biol **20**(6): 477-486.
- Hynes, R. O. (1996). "Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them?" Dev Biol **180**(2): 402-412.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
- Ilic, D., Y. Furuta, et al. (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." Nature **377**(6549): 539-544.
- Iozzo, R. V. and A. D. Murdoch (1996). "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function." FASEB J **10**(5): 598-614.
- Ishizaki, Y., M. D. Jacobson, et al. (1998). "A role for caspases in lens fiber differentiation." J Cell Biol **140**(1): 153-158.
- Jaattela, M., C. Cande, et al. (2004). "Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF." Cell Death Differ **11**(2): 135-136.
- Jarvelainen, H., A. Sainio, et al. (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." Pharmacol Rev **61**(2): 198-223.
- Karsenty, G. (2008). "Transcriptional control of skeletogenesis." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 183-196.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, S. J., D. Gershov, et al. (2002). "I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation." J Exp Med **196**(5): 655-665.
- Kinchen, J. M., J. Cabello, et al. (2005). "Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*." Nature **434**(7029): 93-99.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO J **14**(22): 5579-5588.
- Kuss, P., P. Villavicencio-Lorini, et al. (2009). "Mutant Hoxd13 induces extra digits in a mouse model of synpolydactyly directly and by decreasing retinoic acid synthesis." J Clin Invest **119**(1): 146-156.
- Lauber, K., S. G. Blumenthal, et al. (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." Mol Cell **14**(3): 277-287.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest **115**(10): 2679-2688.
- Lewandoski, M., X. Sun, et al. (2000). "Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development." Nat Genet **26**(4): 460-463.
- Lim, S. T., X. L. Chen, et al. (2010). "Knock-in mutation reveals an essential role for focal adhesion kinase activity in blood vessel morphogenesis and cell motility-polarity but not cell proliferation." J Biol Chem **285**(28): 21526-21536.
- Lohnes, D., M. Mark, et al. (1994). "Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants." Development **120**(10): 2723-2748.
- Loomis, C. A., E. Harris, et al. (1996). "The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning." Nature **382**(6589): 360-363.
- Lussier, M., C. Canoun, et al. (1993). "Interdigital soft tissue separation induced by retinoic acid in mouse limbs cultured in vitro." Int J Dev Biol **37**(4): 555-564.

- Macias, D., Y. Ganan, et al. (1996). "In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud." Anat Embryol (Berl) **193**(6): 533-541.
- Macias, D., Y. Ganan, et al. (1997). "Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development." Development **124**(6): 1109-1117.
- Mamali, I., I. Lamprou, et al. (2009). "A beta integrin subunit regulates bacterial phagocytosis in medfly haemocytes." Dev Comp Immunol **33**(7): 858-866.
- Marchetti, G., S. Escuin, et al. (2010). "Integrin alpha5beta1 is necessary for regulation of radial migration of cortical neurons during mouse brain development." Eur J Neurosci **31**(3): 399-409.
- Matter, M. L. and E. Ruoslahti (2001). "A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription." J Biol Chem **276**(30): 27757-27763.
- McCulloch, D. R., C. M. Nelson, et al. (2009). "ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression." Dev Cell **17**(5): 687-698.
- McGlinn, E. and C. J. Tabin (2006). "Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb." Curr Opin Genet Dev **16**(4): 426-432.
- Merino, R., J. Rodriguez-Leon, et al. (1999). "The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb." Development **126**(23): 5515-5522.
- Metheniti, A., N. Paraskevopoulou, et al. (2001). "Involvement of FAK/Src complex in the processes of Escherichia coli phagocytosis by insect hemocytes." FEBS Lett **496**(1): 55-59.
- Montero, J. A. and J. M. Hurle (2010). "Sculpturing digit shape by cell death." Apoptosis **15**(3): 365-375.
- Montero, J. A., C. I. Lorda-Diez, et al. (2010). "Coordinated and sequential activation of neutral and acidic DNases during interdigital cell death in the embryonic limb." Apoptosis **15**(10): 1197-1210.
- Morris, L., C. F. Graham, et al. (1991). "Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80." Development **112**(2): 517-526.
- Mott, J. D. and Z. Werb (2004). "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 558-564.
- Niswander, L. (2003). "Pattern formation: old models out on a limb." Nat Rev Genet **4**(2): 133-143.
- Parnaik, R., M. C. Raff, et al. (2000). "Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes." Curr Biol **10**(14): 857-860.
- Parr, B. A. and A. P. McMahon (1995). "Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb." Nature **374**(6520): 350-353.
- Parsons, J. T., J. Slack-Davis, et al. (2008). "Focal adhesion kinase: targeting adhesion signaling pathways for therapeutic intervention." Clin Cancer Res **14**(3): 627-632.
- Plows, L. D., R. T. Cook, et al. (2006). "Integrin engagement modulates the phosphorylation of focal adhesion kinase, phagocytosis, and cell spreading in molluscan defence cells." Biochim Biophys Acta **1763**(8): 779-786.
- Polte, T. R. and S. K. Hanks (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10678-10682.
- Pulai, J. I., M. Del Carlo, Jr., et al. (2002). "The alpha5beta1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro." Arthritis Rheum **46**(6): 1528-1535.

- Reddien, P. W. and H. R. Horvitz (2000). "CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*." Nat Cell Biol **2**(3): 131-136.
- Reiske, H. R., S. C. Kao, et al. (1999). "Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration." J Biol Chem **274**(18): 12361-12366.
- Robinson, P. N. and P. Booms (2001). "The molecular pathogenesis of the Marfan syndrome." Cell Mol Life Sci **58**(11): 1698-1707.
- Rodriguez-Leon, J., R. Merino, et al. (1999). "Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling." Nat Cell Biol **1**(2): 125-126.
- Ros, M. A., M. E. Piedra, et al. (1997). "Morphogenetic potential of the chick leg interdigital mesoderm when diverted from the cell death program." Dev Dyn **208**(3): 406-419.
- Rosen, A. and L. Casciola-Rosen (1999). "Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease." Cell Death Differ **6**(1): 6-12.
- Salas-Vidal, E., C. Valencia, et al. (2001). "Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis." Dev Dyn **220**(4): 295-306.
- Saunders, J. W., Jr. (1948). "The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm." J Exp Zool **108**(3): 363-403.
- Scatena, M., M. Almeida, et al. (1998). "NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival." J Cell Biol **141**(4): 1083-1093.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, et al. (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." Nature **372**(6508): 786-791.
- Schwartz, B. R., A. Karsan, et al. (1999). "A novel beta 1 integrin-dependent mechanism of leukocyte adherence to apoptotic cells." J Immunol **162**(8): 4842-4848.
- Schwartz, M. A. (1993). "Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium." J Cell Biol **120**(4): 1003-1010.
- Sears, K. E., R. R. Behringer, et al. (2006). "Development of bat flight: morphologic and molecular evolution of bat wing digits." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6581-6586.
- Slack-Davis, J. K., K. H. Martin, et al. (2007). "Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor." J Biol Chem **282**(20): 14845-14852.
- Stupack, D. G. and D. A. Cheresh (2002). "Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3729-3738.
- Stupack, D. G. and D. A. Cheresh (2004). "Integrins and angiogenesis." Curr Top Dev Biol **64**: 207-238.
- Suzuki, T., S. M. Hasso, et al. (2008). "Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4185-4190.
- ten Berge, D., S. A. Brugmann, et al. (2008). "Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development." Development **135**(19): 3247-3257.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-1316.
- Tickle, C. (2006). "Making digit patterns in the vertebrate limb." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(1): 45-53.
- Todt, W. L. and J. F. Fallon (1986). "Development of the apical ectodermal ridge in the chick leg bud and a comparison with the wing bud." Anat Rec **215**(3): 288-304.
- van der Flier, A., K. Badu-Nkansah, et al. (2010). "Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development." Development **137**(14): 2439-2449.
- van Nimwegen, M. J. and B. van de Water (2007). "Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy." Biochem Pharmacol **73**(5): 597-609.



- Vieira, O. V., R. J. Botelho, et al. (2002). "Phagosome maturation: aging gracefully." Biochem J **366**(Pt 3): 689-704.
- Weatherbee, S. D., R. R. Behringer, et al. (2006). "Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15103-15107.
- Wilkie, A. O., S. J. Patey, et al. (2002). "FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations." Am J Med Genet **112**(3): 266-278.
- Wu, Y., L. Chen, et al. (2002). "beta 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican." J Biol Chem **277**(14): 12294-12301.
- Zakeri, Z. and R. A. Lockshin (2008). "Cell death: history and future." Adv Exp Med Biol **615**: 1-11.
- Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurle (2002). "Programmed cell death in the developing limb." Int J Dev Biol **46**(7): 871-876.
- Zuzarte-Luis, V., J. A. Montero, et al. (2007). "Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death." Dev Biol **301**(1): 205-217.