



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

IRX1 E *IRX2* SON EXPRESADOS Y REGULADOS COORDINADAMENTE POR
EL SEÑALAMIENTO DEL ÁCIDO RETINOICO, TGFB Y FGF DURANTE EL
DESARROLLO DE LA EXTREMIDAD POSTERIOR DE POLLO

TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARTHA ELENA DÍAZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS;
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR;
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSITTUTO DE FISÍOLOGÍA CELULAR
DR. LUIS F. COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D.F
AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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	4
RESUMEN	5
Abstract	6
INTRODUCCION	7
<i>Elementos esqueléticos que conforman a la extremidad</i>	7
<i>La extremidad en el desarrollo embrionario</i>	8
<i>Morfogénesis de la extremidad a nivel molecular</i>	11
<i>La Zona de Progreso (ZP) y diferenciación de los elementos esqueléticos</i>	11
<i>Condrogénesis</i>	14
<i>El factor de transcripción Sox9 y la diferenciación condrogénica</i>	15
<i>Control Molecular en la formación de los dígitos</i>	17
<i>Desarrollo de esqueleto</i>	20
<i>Remodelación del Cartílago por hueso durante el proceso de osificación endocondral</i>	20
<i>Muerte celular interdigital</i>	26
<i>BMP en la muerte celular interdigital</i>	29
<i>Ácido Retinoico (AR)</i>	31
<i>Diferenciación del mesénquima distal: patrón digital-interdigital</i>	34
<i>Factores de transcripción</i>	35
<i>Proteínas con homeodominio</i>	35
<i>Factores de transcripción Iroquois (Irx)</i>	36
JUSTIFICACIÓN	39
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	40
MATERIALES y METODOS	40
<i>Preparación de factores</i>	40
<i>Manipulación del embrión</i>	41
<i>RT-PCR, Sondas e Hibridación In Situ</i>	42
<i>Tinción de muerte celular con Rojo Neutro y Tinción de cartílago con Azul Alciano</i>	43
<i>Inmunofluorescencia y microscopia confocal</i>	43
RESULTADOS	44
<i>Expresión de Irx1 e Irx2 (Irx1/2) y su correlación con los eventos de condrogénesis, y de muerte celular interdigital</i>	44
Figura9. Expresión de los genes Irx1/2 es regulada negativamente en el tejido interdigital y coincide con el inicio de la muerte celular	46
<i>El AR regula negativamente la expresión de Irx1/2 antes de la MCP</i>	46
Figura 10. Previo a la MCP, el AR independiente de BMP7, inhibe la expresión de Irx1/2	48
<i>El AR regula negativamente a Irx1 e Irx2 en la punta de los dedos</i>	49
Figura 11. El AR inhibe la expresión de Irx1/2 en la punta de los dedos	49

<i>TGFβ</i> Regula la expresión de <i>Irx1/2</i> durante la Condrogénesis	50
.....	51
Figura 12. TGFβ regula a <i>Irx1/2</i> en una manera estadio-dependiente en el tejido interdigital	51
<i>Concentraciones de TGF-β modulan la expresión de Irx1/2</i>	51
Figura 13. La expresión de <i>Irx1/2</i> se regula por TGFβ de una manera dependiente de la concentración-	52
Figura 14. TGFβ regula la expresión de <i>Irx1/2</i> en la punta del dedo	53
<i>Irx2 es regulado por el señalamiento de FGF</i>	53
Figura 15. FGF regula negativamente la expresión de <i>Irx2</i>	54
<i>Irx1/2 en la formación de las articulaciones</i>	55
.....	56
DISCUSION.....	57
Figura 17. Modelo de interacciones que muestra la regulación de <i>Irx</i> por RA, TGFβ y FGF	61
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	64

ABREVIATURAS

ADH	Aldehído Deshidrogenasas
AAZ	Anterior Apoptotic Zone
AER	Cresta Ectodérmica Apical
ALK	Receptor de Activinas “like-Kinases”
AR	Ácido Retinoico
BMP	Proteína Morfogénica de Hueso
<i>c-Iro</i>	Complejo <i>Iroquois</i>
Col II	Colágena tipo II
FGF	Factor de crecimiento de Fibroblastos
FgfR-1	Receptor del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos
GDF	Factor de Crecimiento y Diferenciación
IAZ	Interdigital Apoptotic Zone
PAZ	Posterior Apoptotic Zone
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
RALDH	Retinaldehído Deshidrogenasa
RAR	Receptor del Ácido Retinoico
RARE	Elementos de Respuesta a Ácido Retinoico
RXR	Receptores a Retinoides X
SDR	Deshidrogenasas de cadena corta
Shh	Sonic Hedhegog
Sox9,	Región determinante del Sexo Y-9
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante β
TNFR	Factor de Necrosis Tumoral (del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor)
TUNEL	deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling
Wnt	Tipo Wingless
ANZ	Zona Necrótica Anterior (del inglés Anterior Necrotic Zone)
INZ	Zona Necrótica Interdigital (del inglés Interdigital Necrotic Zone)

PNZ	Zona Necrótica Posterior (del inglés Posterior Necrotic Zone)
ZP	Zona de Progreso (del inglés Progress Zone)
ZPA	Zona de Actividad Polarizante (del inglés Zone of Polarizing Activity)

RESUMEN

Los genes homeóticos *Iroquois* (*Irx*) juegan un papel crucial en la regionalización y en el patrón de tejidos y órganos durante el desarrollo de los metazoarios. El patrón de expresión de *Irx1* e *Irx2* en el desarrollo de la extremidad posterior del pollo ha sido estudiado en diferentes especies, sin embargo su regulación no ha sido abordada. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de *Irx1* e *Irx2* así como también su regulación por factores clave del desarrollo de la extremidad del pollo. Los factores evaluados en este estudio son: el ácido retinoico (AR), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF). Observamos que, *Irx1* e *Irx2* fueron expresados coordinadamente en el tejido interdigital, en los primordios digitales, en las articulaciones y en el límite entre el tejido cartílago y no cartílago. La regulación negativa de *Irx1* e *Irx2* en el tejido interdigital coincide con el inicio de la muerte celular. Se encontró que el AR regula negativamente la expresión de *Irx1* e *Irx2* por un mecanismo independiente a BMP antes de cualquier evidencia de muerte celular. Además la proteína TGF β en el tejido interdigital, regula a *Irx1* e *Irx2* de una manera estadio-dependiente. En estadio 27HH, el tratamiento por 8 horas inhibe su expresión. Cuando se administra TGF β en los estadios del desarrollo 28HH y 29HH que son caracterizados por la ausencia de la expresión interdigital de *Irx1* e *Irx2*. Se puede observar, que son inducidos en el dedo en formación y marcan los límites del cartílago. Por otra parte, observamos que la expresión de *Irx2* se inhibió cuando se administró FGF8 o FGF10 en el área debajo de la zona de progreso (ZP) en 24HH. Se trató de evaluar, efecto de bloquear la actividad de la vía de señalamiento FGF. Sin embargo, el tratamiento de SU5402, inhibidor de los receptores de FGF, disparó la muerte celular y nos imposibilitó observar su efecto sobre la regulación de *Irx1* e *Irx2*. En conjunto nuestros resultados apoyan observaciones realizadas en otras especies de vertebrados, en los que *Irx1* e *Irx2*

son coordinadamente expresados y regulados durante el desarrollo, indicando la existencia de una arquitectura genómica conservada en el grupo de los *Irx*.

Abstract

The *Iroquois* homeobox (*Irx*) genes play a crucial role in the regionalization and patterning of tissues and organs during metazoan development. The *Irx1* and *Irx2* gene expression pattern during hindlimb development has been investigated in different species, but its regulation during this morphogenesis process has not been explored yet. The aim of this study was to evaluate the gene expression pattern of *Irx1* and *Irx2* as well as their regulation by important regulators of hindlimb development such as retinoic acid (RA), transforming growth factor β (TGF β) and fibroblast growth factor (FGF) signaling during chick hindlimb development. Our results show that *Irx1* and *Irx2* were coordinately expressed in the interdigital tissue, digital primordia, joints and in the boundary between cartilage and non-cartilage tissue. Down-regulation of *Irx1* and *Irx2* expression at the interdigital tissue coincided with the onset of cell death. RA was found to down-regulate their expression by a bone morphogenetic protein-independent mechanism before any evidence of cell death. Furthermore, TGF β protein regulated *Irx1* and *Irx2* in a stage-dependent manner at the interdigital tissue, it inhibited their expression when it was administered to the interdigital tissue at developing stages before their normal down-regulation. TGF β administered to the interdigital tissue at developing stages after normal down-regulation of *Irx1* and *Irx2* evidenced that expression of these genes marked the boundary between cartilage tissue and non-cartilage tissue. It was also found that at early stages of hindlimb development FGF signaling inhibited the expression of *Irx2*. The present study demonstrates that *Irx1* and *Irx2* are coordinately expressed and regulated during chick embryo hindlimb development as occurs in other species of vertebrates supporting the notion that the genomic architecture of *Irx* clusters is conserved in vertebrates.

INTRODUCCION

Elementos esqueléticos que conforman a la extremidad

En los tetrápodos, las extremidades se ubican en el eje antero-posterior y pueden ser anteriores o posteriores, están constituidas por 3 segmentos con un número variable de elementos esqueléticos dentro de cada segmento. El segmento próximal tiene 1 elemento esquelético (estilópodo), el medial tiene 2 elementos (zeugópodo) y el distal (autópodo) es el más variable entre los tetrápodos y puede conformarse desde uno hasta 5 elementos esqueléticos. El autópodo del humano corresponde a la mano o el pie e incluyen los huesos que se encuentran en la palma de la mano o la planta del pie, los pulgares y los dedos de la mano y del pie (Fig.1).

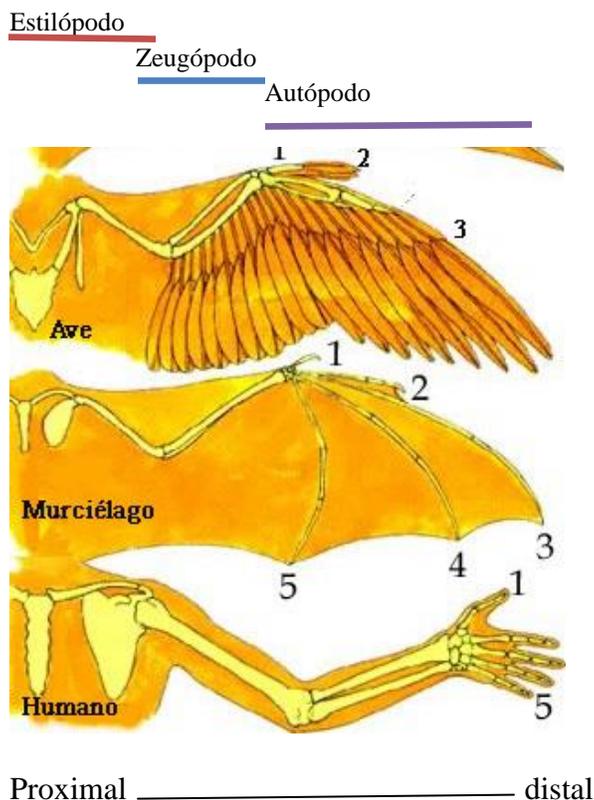


Figura1. Segmentos esqueléticos que conforman a la extremidad. En dirección próximo-distal se encuentra el estilópodo con un elemento, el zeugópodo con dos elementos y el autópodo con número variable de elementos. Imagen modificada de Internet.

En la escala evolutiva, la formación y el origen de los segmentos de la extremidad se ha conservado entre los tetrápodos, aunque características más finas como son el número de falanges y la presencia de membrana interdigital parecen estar relacionadas con la adaptación del organismo a su ambiente. La manipulación experimental que se realiza en el embrión en desarrollo de organismos modelo, ha permitido entender cómo se genera el arreglo de las estructuras, la especialización de las células y los tejidos; además a dado indicios de los mecanismos moleculares involucrados (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001; Saunders, 1998; Tickle, 2003).

La extremidad en el desarrollo embrionario

En el desarrollo embrionario, la extremidad inicia su morfogénesis a partir de un abultamiento situado a los costados del eje antero-posterior del cuerpo del embrión y que se le conoce como el primordio de la extremidad. Se caracteriza por tener células de origen mesodérmico no diferenciadas que están cubiertas por células ectodérmicas. La interacción entre el mesodermo y el ectodermo que componen al primordio, es indispensable para el arreglo o patrón adecuado de la extremidad. En el primordio, se establecen 3 centros organizadores que son responsables de la formación de los ejes de simetría: el eje dorso-ventral, el eje próximo-distal y el eje antero-posterior. Los centros organizadores, actúan de manera coordinada en las células responsivas dístales, que a su vez, adquieren su polaridad e identidad celular en la extremidad (Fig.2). De esta forma podemos reconocer diferencias en los ejes de la extremidad, entre el dedo pulgar y meñique (eje anterior-

posterior); entre la palma de la mano y los nudillos (eje dorsal-ventral), además de un crecimiento específico desde el brazo hasta la mano (eje próximo-distal). Una vez que se han establecido los ejes, la diferenciación de los elementos de la extremidad se lleva a cabo en dirección proximal-distal, es decir, primero se hace evidente el estilópodo, después el zeugópodo y por último el autópedo (Saunders, 1948).

Los primeros trabajos realizados para entender la formación de los patrones en la extremidad fueron a través de la destrucción o alteración de las relaciones topográficas de sus componentes (Saunders, 1948). De esta manera, se reconocieron tres centros de señalamiento u organizadores: la cresta ectodérmica apical (del inglés Apical Ectodermal Ridge), la Zona de Actividad Polarizante (del inglés Zone of Polarizing Activity) y el ectodermo dorsal, que en su conjunto, son la base de las interacciones celulares involucrados en el patrón de formación de la extremidad. Recientemente con los estudios realizados a nivel molecular y genético se ha ampliado la información sobre su modo de acción en la extremidad (Fernández-Terán and Ros, 2008).

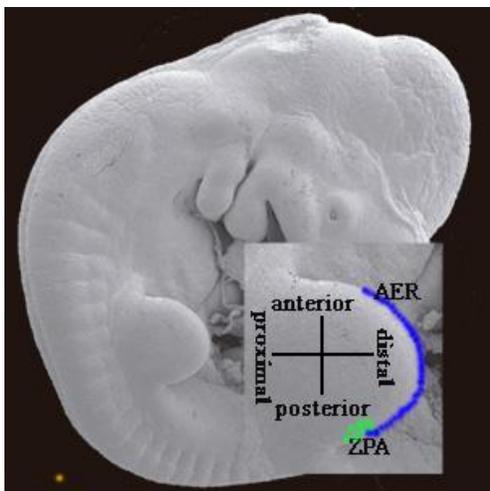


Figura 2. Embrión en desarrollo de ratón de estadio 10.5. Se dibujó sobre el primordio una línea en azul para representar la AER, mientras que en verde se representa la ZPA. Zeller et al., 2009

La AER es una estructura que está presente durante toda la morfogénesis de la extremidad. La constituyen células epiteliales especializadas que forman un engrosamiento; éste recorre todo el borde de la región distal entre el eje dorso-ventral en la extremidad. El retirar la AER, produce la pérdida de los elementos esqueléticos en embriones de pollo. Entre más temprano en el desarrollo se realiza esta remoción, la extremidad se ve más afectada (Saunders, 1996). Del trabajo experimental realizado por Saunders (1948) se obtuvieron dos conclusiones; se demostró que la AER ejerce una inducción sobre las células mesenquimales indispensable para la elongación de la extremidad, además aporta información necesaria para el patrón de los elementos esqueléticos en el eje próximo-distal (Saunders, 1948).

El centro organizador de la ZPA, está compuesto por células mesenquimales de la región posterior del primordio de la extremidad. Los trasplantes realizados de las células de la región posterior hacia la región anterior del primordio, permitieron delimitar la zona con capacidad de inducir duplicaciones en imagen especular de la extremidad (Saunders, 1996). El responsable de estas duplicaciones es el morfógeno Sonic hedgehog (*Shh*) que se expresa en la ZPA. La proteína SHH, mediante un gradiente de concentración es capaz de reproducir todas las características de la ZPA (Riddle et al., 1993). La inhibición de SHH, da como resultado disminución del tamaño de los elementos proximales y la pérdida de los dedos, lo que demuestra su importancia en la formación digital dentro del eje antero-posterior (Chiang et al., 1996).

La formación del eje dorso-ventral, está dada por el ectodermo perteneciente a la región dorsal. MacCabe y col. (MacCabe et al., 1974) demostraron que el trasplante del mesodermo dorsal a una región ventral da como resultado una extremidad con dos regiones dorsales. El factor causante de la dorsalización pertenece la familia de proteínas Wnt, *Wnt7a*. El ratón mutante para *Wnt7a* presenta el autópodo con biventralidad (Parr and McMahon, 1995). *Wnt7a* se expresa desde estadios muy tempranos y actúa mediante el gen *Lmx-1* que se expresa en el mesodermo de la región dorsal, pudiendo este último reproducir el efecto causado por *Wnt7a* (Altabef and Tickle, 2002).

Morfogénesis de la extremidad a nivel molecular

La Zona de Progreso (ZP) y diferenciación de los elementos esqueléticos

De acuerdo al modelo de la zona de progreso (ZP, del inglés Progress Zone) propuesto por Wolpert (Wolpert, 2002), está abarca alrededor de 300 micrómetros bajo la AER y la componen células indiferenciadas y en estado proliferativo. En esta región, la permanencia de las células en la ZP define su diferenciación. El modelo propone que, se genera algo semejante a un gradiente, pero de tiempo, en el que las células que menos tiempo estén en la ZP se diferencian en estructuras proximales, mientras que, las estructuras distales requieren de mayor tiempo en la ZP (Summerbell and Lewis, 1975; Tickle et al., 1975; Wolpert et al., 1975) (Fig.3). Pearse y col. (Pearse et al., 2007) siguieron el destino de las células de la ZP entre los estadios 16-20HH del pollo y encontraron que, estas células

no tienen una tendencia a formar parte de un linaje en particular. De esta manera, pueden dar lugar a componentes del cartílago, tendones, tejido conectivo del músculo y dermis de la extremidad.

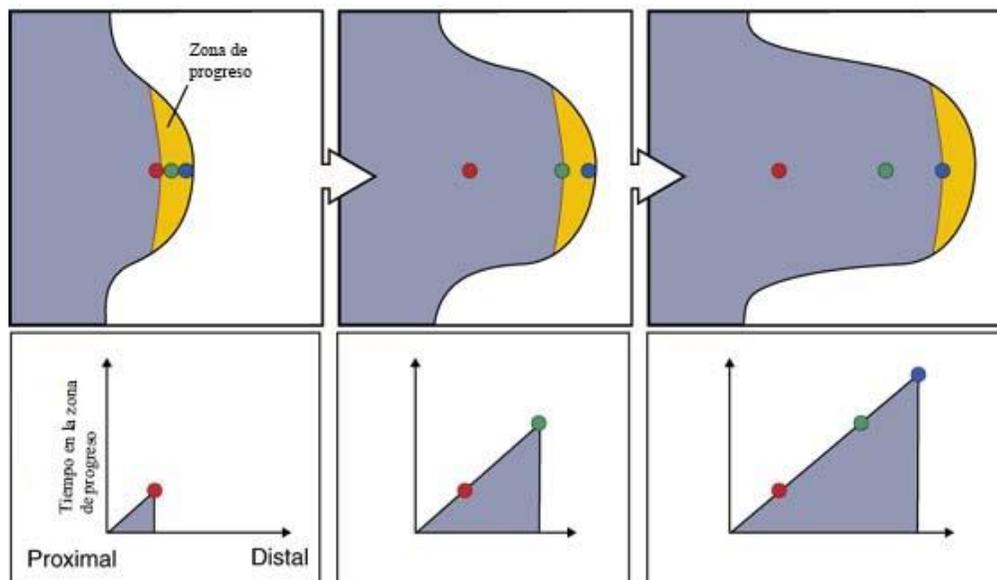


Figura 3. Modelo de la zona de progreso (ZP). El valor posicional de una célula en el eje próximo-distal depende del tiempo en que permanece en la ZP en amarillo. El punto en color rojo representa un menor tiempo, el verde uno intermedio, mientras que azul representa al mayor tiempo en la ZP. (Wolpert, 2002).

El mantenimiento del estado indiferenciado y la sobrevivencia de la ZP dependen de la AER. Los factores que se expresan en esta región son *Fgf4*, *Fgf9*, *Fgf8* y *Fgf17* (Sun et al., 2002). En extremidades en las cuales fue extirpada la AER, es posible rescatar su desarrollo con la implantación de perlas embebidas con cualquiera de las proteínas FGF8, FGF4 o FGF2 colocadas en la región distal del primordio (Crossley et al., 1996; Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993). Sin embargo, se conoce que *Fgf4* y *Fgf17* no son los

principales efectores de la AER ya que los ratones mutantes para estos genes no presentan defectos en la extremidad (Moon et al., 2000; Xu et al., 2000). En contraste, el ratón mutante del gen *Fgf8* si presenta un fenotipo severo, en el que los elementos esqueléticos son reducidos, no tienen radio (parte del zeugopodo) y algunos componentes del autópodo. La expresión de *Fgf8* se sitúa en la AER por lo que se ha señalado como el mediador de la AER (Lewandoski et al., 2000). La regresión natural de la AER en estadios avanzados del desarrollo de la extremidad, se acompaña de la disminución de la expresión de *Fgf8*. En las áreas interdigitales esta disminución de la expresión está estrechamente relacionada con el inicio de la muerte celular interdigital (Hernández-Martínez and Covarrubias et al., 2009; Wanek et al., 1989).

El establecimiento de la AER ocurre por la retroalimentación positiva entre los señalamientos de WNT y FGF (Kawakami et al., 2001). La familia de genes *Wnt* participa en la inducción, mantenimiento y regresión de la AER. La ruta canónica de *Wnt*, *Wnt*/ β -catenina está activa cuando se une el ligando extracelular al receptor Frizzled y a los correceptores de superficie celular LRP5 y LRP6 (de las siglas del inglés low-density lipoprotein receptor-related protein). El complejo conformado por el ligando y el receptor inicia la activación de la proteína intracelular Dishevelled, que inhibe la formación del complejo GSK3/APC/Axín, de esta manera se evita el marcaje de β -catenina para su ubiquitinación y su degradación. Esto lleva a la acumulación de β -catenina en el citoplasma de donde se transloca al núcleo activando genes blanco (Staines K et al., 2012) (Fig4.). Se conoce que, entre los límites del lado dorsal y el lado ventral del ectodermo se expresa *Wnt-3a*, esta expresión temprana demarca la región de formación de la AER. Su función en esta región es la de inducir la expresión de *Fgf8* en el ectodermo. Por otra parte,

los efectos de sobreexpresar *Wnt-3a* o de β -catenina en la región del mesodermo, son de inducciones de los marcadores de la ZP como son *n-Myc* y *Msx1*, además de *Bmp2*, *Fgf4* y *Fgf8*. En conjunto, estos resultados indican que el señalamiento mediado por *Wnt3a* está por arriba en la cascada molecular que lleva a la inducción de la AER (Kengaku et al., 1998). Adicionalmente, la expresión de *Wnt6* se observa en la AER, mientras que la actividad de β -catenina se ha detectado en el ectodermo dorsal de la extremidad. Se ha propuesto que su función es inhibir la condrogénesis y promover la proliferación de las células mesenquimales que están justo por debajo de la zona de expresión. (Geetha-Loganathan et al., 2005; ten Berge et al., 2008).

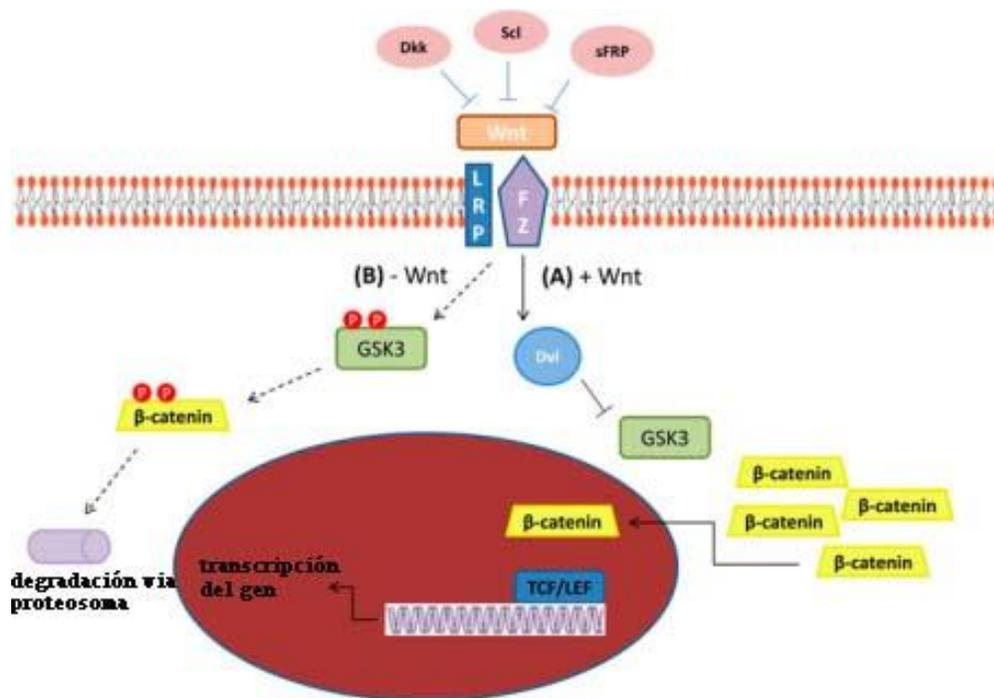


Figura4. Representación de la vía de Wnt- β catenina. El complejo ligando-receptor (Wnt y FZ) activa a Dvl que a su vez inactiva al complejo de degradación en el que está involucrado GSK3. Este complejo se encarga del marcaje de β -catenina para su degradación vía proteosoma. La inhibición del complejo de degradación permite la acumulación de β -catenina en el citoplasma y su translocación al núcleo en el que funciona modula transcripción. Dkk, sRFP y SCL son inhibidores de Wnt (en rosa) Tomado de internet.

El factor de transcripción Sox9 y la diferenciación condrogénica

La mayoría de los huesos del esqueleto apendicular se desarrollan por medio de osificación endocondral. El proceso involucra la formación de un molde de cartílago a partir del cual ocurre la diferenciación de las células mesenquimales hacia condrocitos. Los condrocitos, forman un molde de cartílago que se elonga y que posteriormente van reemplazarse por osteoblastos con una matriz mineralizada de hueso. A este proceso se conoce como osificación endocondral.

La diferenciación de las células mesenquimales hacia condrocitos es dependiente de la expresión del factor de transcripción *Sox9*, se expresa tempranamente en las células precursoras del cartílago y se mantiene en todos los condrocitos excepto durante la hipertrofia del cartílago (Lefebvre et al., 1997; Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997). En el modelo del ratón, la inactivación condicional de *Sox9* en el inicio de la agregación de las condensaciones provoca la pérdida total de las mismas, por lo que no hay formación de cartílago y hueso endocondral, mientras que su inactivación durante o después de la formación de las condensaciones produce una severa condrodisplasia y alteración en la formación de las articulaciones (Akiyama et al., 2002; Wagner et al., 1994). En el humano la mutación heteróciga del gen *Sox9* produce el síndrome conocido como displasia campomélica causando hipoplasia de la mayoría de los huesos formados por osificación endocondral (Wagner et al., 1994).

Adicionalmente, los factores de transcripción *Sox5* y *Sox6* se expresan en todos los condroprogenitores y los condrocitos diferenciados. Estos factores cooperan en la activación de *Col II*, principal marcador de matriz extracelular de cartílago (Lefebvre et al., 1998). La inactivación individual de *Sox5* y *Sox6* no genera grandes alteraciones en los elementos esqueléticos, pero cuando se realiza la doble mutación *Sox5/Sox6* se genera una severa y generalizada condrodisplasia y se observa que, las células permanecen como condensaciones mesenquimales y sin evidencia de la formación de cartílago (Smits et al., 2001). El resultado de la activación de los genes *Sox* es la regulación positiva de los genes que codifican para componentes del cartílago como los proteoglicanos *Col II*, *Col IX* y el *Agrecano* (Lefebvre et al., 1997; Sekiya et al., 2000; Shum and Nuckolls, 2002; Smits et al., 2001).

La agregación de células mesenquimales precursoras de cartílago requiere de la interacción célula-célula y célula-matriz (Daniels and Solursh, 1991). La formación de las condensaciones condrogénicas coincide con la expresión de los genes *Col I*, *Fibronectina* y proteoglicanos (Dessau et al., 1980; Kulyk et al., 1989; Shinomura et al., 1990; von der Mark et al., 1976). Mientras que la *N-caderina*, mantiene la adhesión de las células dentro de la condensación (Delise and Tuan, 2002) y las proteínas N-CAM estabilizan y mantienen a las condensaciones (Hall, 2000). De esta manera, en un estado avanzado de diferenciación, *Col II*, *Col IX*, *Col XI* y el *Agrecano* son componentes específicos del fenotipo condrogénico.

Control Molecular en la formación de los dígitos

El autópodo adquiere su apariencia con la formación de dígitos y con el tejido interdigital que los separa. En el embrión de pollo, las áreas digitales son positivas al marcador *Sox9* y su expresión inicia desde la región posterior hacia la anterior en el autópodo. Por otra parte, las células pertenecientes al tejido interdigital expresan *Raldh2*, enzima que media la síntesis del Ácido Retinoico (AR) y que está involucrado en la muerte del tejido interdigital. De esta manera, es frecuente encontrar la expresión restringida de genes a ciertas áreas. Su localización específica los involucra ya sea con el proceso de muerte celular o condrogénesis de acuerdo a su sitio de expresión (Fig5).

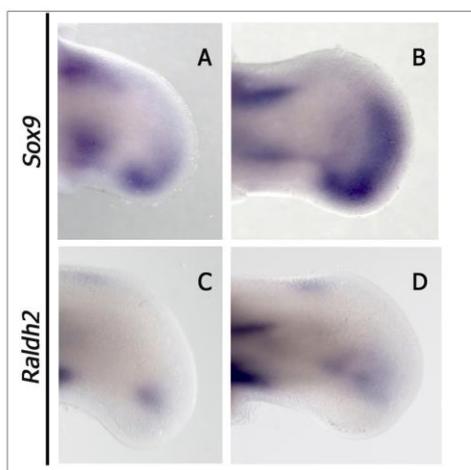


Figura5. Hibridación *in situ* para *Sox9* que se expresa en las regiones condrogénicas (A en E23 y B en E26) y *Raldh2* en las regiones presuntivas interdigitales (E23 en C y E26 en D) de las extremidades posteriores del pollo (Chimal-Monroy et al., 2011).

TGFβ/Activinas y BMP en la condrogénesis

En vertebrados, la superfamilia de TGFβ (del inglés Transforming Growth Factor beta) está constituida por 33 genes. La proteína se procesa como heterodímero u homodímeros de secreción. Las proteínas BMP, GDF, Activinas/Inhibinas son considerados miembros de esta familia (Mueller and Nickel, 2012). La transducción de la señal de TGFβ se lleva a cabo por la unión del ligando en su forma dimerizada a los receptores tipo II constitutivamente activos y después a los receptores tipo I o ALK formando un complejo heterotetramérico. Los receptores tipo I y tipo II presentan un dominio citoplásmico con una fuerte actividad de serina/treonina-cinasa y una débil actividad tirosina-cinasa (Groppe et al., 2008). La activación del receptor tipo I fosforila a las proteínas citoplásmicas Smad en la región C-terminal, en particular las R-Smad (Smad reguladoras), que una vez activas forman oligómeros con la Smad4 o Co-Smad, este complejo se transloca al núcleo regulando la expresión de genes blanco (Moustakas and Heldin, 2009; Moustakas et al., 2002) (Fig6).

Estas proteínas participan en diversos procesos durante el desarrollo, incluyendo la gastrulación, formación de los ejes embrionarios, morfogénesis de órganos y en el mantenimiento de la homeostasis en el adulto (Moustakas and Heldin, 2009). A nivel celular, TGFβ inhibe la proliferación de células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas, regula la diferenciación de tipos celulares del sistema inmune, neuronal, mesenquimal y epitelial (Heldin et al., 2009; Massague and Chen, 2000; Moustakas et al., 2002). El antagonismo de las funciones de la superfamilia TGFβ está mediada por las proteínas

DAN, Noggin, Follistatin, Chordin, que actúan a través de la unión al ligando previniendo su acceso a su receptor, (Massague and Chen, 2000).

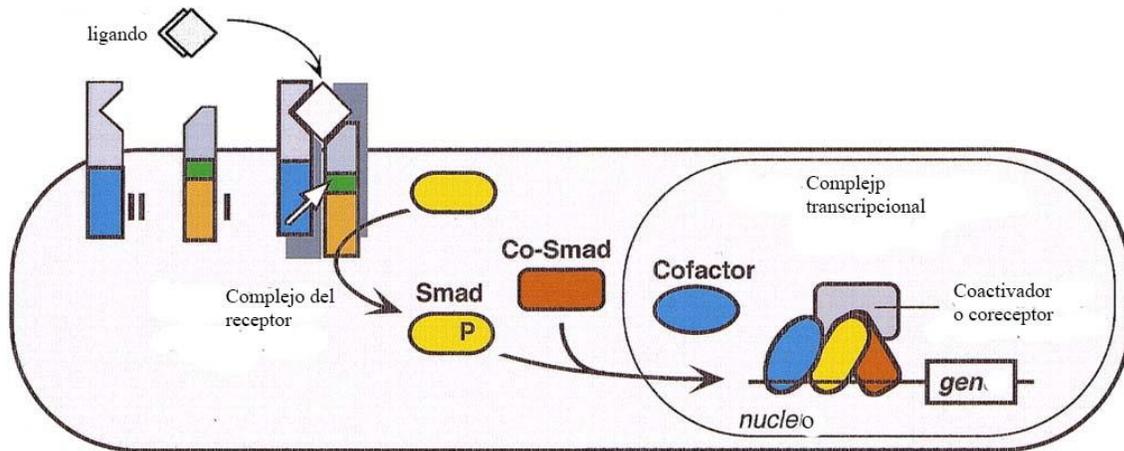


Figura 6. Vía de señalamiento de la superfamilia TGF β a través de las proteínas SMAD. El ligando se une al complejo de receptores tipo I/ II, esto permite la fosforilación de las SMAD en el citoplasma, las cuales se ensamblan en un complejo transcripcional que se transloca al núcleo regulando la actividad de genes blanco (Massague and Chen, 2000) .

Por otra parte, las proteínas BMP participan en diferentes fases de la formación del hueso, promueven la diferenciación condrogénica (Duprez et al., 1996). Por ejemplo, BMP2, BMP4 y BMP7 inducen la diferenciación de células mesenquimales hacia precursores de osteoblastos (Hanada et al., 2001). En el ratón, la ausencia de BMP7 produce polidactilia de las extremidades posteriores, mientras que, en el doble mutante *Bmp2/Bmp7* le faltan algunas de las condensaciones condrogénicas (Bandyopadhyay et al., 2006). Las distintas afinidades de los receptores tipo I (BMPRIA, BMPRIB y ActRI) por los ligandos pueden ser lo que contribuye a la diversidad de sus funciones durante el desarrollo (ten Dijke et al., 2003; Yoon et al., 2005). De esta manera, se sugiere que la expresión de *BmpR1b* en las condensaciones condrogénicas y la expresión de *BmpR1a* en el

mesénquima pueden indicar una exclusividad funcional de los receptores. Pudiendo ser a este nivel, el responsable del antagonismo de las funciones de BMP en las áreas digitales e interdigitales.

Sin embargo, en la vía de transducción, la mutación individual de las *Smad* no causa efecto alguno, los animales son fértiles y viables. Aunque, la combinación de mutaciones en *Smad1/5* o *Smad1/5* y *Smad 8* generan una severa condrodisplasia (Retting et al., 2009). Un efecto similar se observa con la combinación de *Bmpr1a^{CKO}/Bmpr1b^{-/-}*. En suma, estos efectos se atribuyen a defectos en la proliferación, la sobrevivencia y la diferenciación. Estos resultados muestran las funciones redundantes tanto de las proteínas como de los receptores de BMP (Yoon et al., 2005).

Desarrollo de esqueleto

Remodelación del Cartílago por hueso durante el proceso de osificación endocondral

Los huesos del esqueleto apendicular se desarrollan por medio de osificación endocondral, el proceso utiliza el molde de cartílago previamente formado como templado. Dentro del molde, los condrocitos proliferan formando una columna rodeada por células mesenquimales del pericondrio. Aquí, los condrocitos están organizados de acuerdo a su estado de diferenciación, ya sea en proliferación, maduración o apoptosis, formando la placa de crecimiento. Las células en proliferación se localizan en cada extremo y se encuentran en progresión hacia la diferenciación en el centro del elemento. Conforme

avanzan en la prehipertrofia, dejan de expresar marcadores de cartílago y permanecen en arresto mitótico con evidente incremento del tamaño celular (Shimizu et al., 2007). El factor de transcripción *Runx2* (*Cbfa*) y el cambio a una matriz extracelular compuesta por Col X son característicos de la maduración de los condrocitos y de los osteoblastos (Enomoto et al., 2003). La expresión de *Runx2* en condrocitos en proliferación produce la inducción de *Col X*, lo que es indicativo de que han entrado a la fase hipertrófica. Se conoce que RUNX2 tiene como blanco transcripcional a *Col X* durante la osteogénesis (Zheng et al., 2003). Los condrocitos maduros presentan una matriz mineralizada, con expresión de los genes *Osteopontina* (OPN), *Osteocalcina* (OSC) y la sialoproteína del hueso, indispensables para la diferenciación de los osteoblastos (Ducy et al., 1997; Sodek et al., 1996). Los condrocitos hipertróficos que ahora están rodeados por una matriz calcificada, entran al proceso de muerte celular, probablemente esto se deba al recambio de la matriz (Ferguson et al., 1998; Vu et al., 1998). Al mismo tiempo, las células del pericondrio se diferencian hacia osteoblastos y requieren la invasión de los vasos sanguíneos para ingresar al molde, dando paso al primer centro de osificación. De esta forma la osificación se extiende desde el centro del elemento hacia los extremos. El proceso continúa en el periodo postnatal, permitiendo un aumento de la estatura del individuo (Fig.7).

Pasos de la diferenciación	Características histológicas	Marcadores de matriz extracelular	Marcadores que dirigen la diferenciación
Cels mesenquimales		<i>Col1a1</i>	<i>Sox9, Runx2</i>
condrocitos		<i>Ncam1, Tnc (Col2a1)</i>	<i>Sox9 (Sox5, Sox6)</i>
condroblastos en fase temprana		<i>Col2a1, Agc1, Crtl1 (Comp, Crtm)</i>	<i>Sox5, Sox6, Sox9 (Fgfr3, Atf2, Nkx3.2)</i>
condroblastos columnares		<i>Col2a1, Agc1, Crtl1 Comp, Crtm</i>	<i>Sox5, Sox6, Sox9 Fgfr3, Atf2, Nkx3.2</i>
condrocitos prehipertrofos		<i>Col2a1, Agc1, Crtl1 Comp, Crtm (Col10a1)</i>	<i>Pthr1, Ihh Runx2, Runx3</i>
condrocitos hipertrofos		<i>Col10a1</i>	<i>Runx2, Runx3, Vegf, (c-Maf)</i>
condrocitos de la fase terminal		<i>Mmp13, Spp1</i>	<i>Runx2, c-Maf</i>

Figura 7. Resumen de características morfológicas y de marcadores de matriz extracelular, así como de los factores clave en la diferenciación durante el proceso de osificación endocondral (Lefebvre et al., 1997)

Diferenciación de los condrocitos hacia el fenotipo articular.

Finalmente, una articulación madura consta de dos superficies articulares opuestas y separadas por el líquido sinovial y la rodea una cápsula sinovial a la cual se anclan los ligamentos. Las articulaciones sinoviales, se localizan entre los elementos de hueso, lo que complica conocer parte de su estructura, su organización y las señales moleculares necesarias para formación.

Una articulación, se forma a partir de los condrocitos en proliferación del molde de cartílago y, solo los que van a formar las articulaciones no continúan con el proceso de osificación endocondral. Esto es apoyado por la observación de una baja en la expresión de los marcadores condrogénicos *Sox9* y *Col II*, lo que sugiere una inhibición de la diferenciación (Spatar et al., 2006a). Adicionalmente, en la región de formación de una articulación se expresan los factores *Gdf5*, *Gdf6*, *Bmp2* y *Bmp4* así como los antagonistas

de su señalamiento *Noggin*, *Cordina*, los miembros de la familia WNT, *Wnt9a*, *Wnt4*, así como *Gli3* y *Autotaxina* (Brunet et al., 1998; Hartmann and Tabin, 2001).

De lo que se conoce de su desarrollo, es que en los sitios donde se forma una articulación se observan características muy particulares. Iniciando con la interzona que es una región de células con forma aplanada y que están organizadas en tres capas, dos de alta densidad celular y una capa intermedia de menor densidad, que se elimina por el proceso de muerte celular. Posteriormente, la cavidad producida por la pérdida de la capa intermedia, se ocupa por el líquido sinovial que tiene como característica la presencia de altas concentraciones de hialuronato (HA). El receptor del hialuronato, CD44, se expresa en la interzona (Dowthwaite et al., 1998).

Debido a que a la posición que ocupa articulación dentro del elemento esquelético, los cambios que pudieran darse en la fase de diferenciación y maduración de los condrocitos, la inhibición de la muerte celular, el crecimiento excesivo de los elementos esqueléticos así como algún cambio en las moléculas de matriz extracelular afectan sustancialmente su correcta formación (Spicer and Tien, 2004)..

Las articulaciones requieren de la interzona para su formación, sin embargo se ha especulado mucho acerca de su origen y de su inducción. Se ha sugerido que la interzona es consecuencia de la presión provocada por el crecimiento de los elementos adyacentes, generando el aplanamiento característico de estas células. Sin embargo, aun cuando se elimina uno de los elementos esqueléticos contiguos a la interzona, ésta se forma, lo que indica que, es una región que provee de las células progenitoras de la articulación (Fell and

Robison, 1934). *Gdf5* es el marcador más temprano que se expresa en la interzona y por lo tanto en la presuntiva región articular. Aunque, no ha quedado claro que función tiene en esta región, debido a que GDF5 tiene una alta capacidad de diferenciar a las células hacia el linaje condrogénico, igual que varios de los miembros de la superfamilia de TGF β . Las mutaciones en *Gdf5* causan defectos en las articulaciones tanto del ratón como en el humano (Storm et al., 1994).

Por otra parte, dentro de los genes expresados en la interzona. Se han hecho tratamientos con *Wnt9a* o *Noggin*, los cuales inhiben la condrogénesis. Adicionalmente, el mutante de *Noggin* carece de articulaciones. Así, es probable que la actividad inhibitoria de dichos factores ante la condrogénesis, pudiera ayudar a prevenir la fusión de los elementos. (Brunet et al., 1998; Spater et al., 2006b). Con esta información, se propone que las células que expresan *Gdf5* tienen la capacidad de mantenerse en los sitios de formación de las articulaciones, coexistiendo con señales involucradas en la diferenciación condrogénica y en el mantenimiento del estado indiferenciado (Koyama et al., 2008). De esta manera, se sugiere que la formación de la interzona pudiera darse por un balance de señales condrogénicas e inhibitoras de la condrogénesis.

En la región articular, se expresan *Wnt4*, *Wnt16* y *Wnt9a*, los cuales tienen efectos opuestos en la condrogénesis. Por un lado, la sobreexpresión de *Wnt4a* acelera la maduración de los condrocitos (Hartmann and Tabin, 2001) y por otro, la sobreexpresión de *Wnt9a* inhibe la diferenciación de cartílago y regula negativamente a *Sox9* y *Col II* e induce la expresión de *Cd44*, *Gdf5*, *Cordina* y *Wnt4* (Hartmann and Tabin, 2001). Además, la vía de Wnt, β -catenina, está activa en las regiones presuntivas de la articulación. Su

bloqueo produce fusión de los elementos, mientras que el efecto de sobreexpresar la vía induce la expresión de *Gdf5*, *Cordina* y *Fgf18*, los que podrían marcar el inicio de una articulación ectópica (Guo et al., 2004). De esta manera, las proteínas WNT de la interzona actúan de forma redundante para activar la señalización canónica en la formación de una articulación.

Adicional a las funciones que tiene la matriz extracelular en los procesos de diferenciación, proliferación y sobrevivencia, dentro de la interzona, ésta puede contribuir a adquirir sus características particulares. Las integrinas de la familia $\beta 1$ son receptores de adhesión a la matriz extracelular y se expresan en los condrocitos (Aszodi et al., 2003; Grashoff et al., 2003). Su bloqueo inhibe la formación de condensaciones condrogénicas en cultivos (Shakibaei, 1998). Se ha propuesto que, la inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$ que se expresa en el pericondrio, es la señal inductora de la formación de las articulaciones. La inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$, lleva a la expresión de las moléculas características de la interzona (*Wnt9a*, *Ggf5*, *Cordina*, *Autotaxina* y *Col I*) (Fig.8). De esta manera, la formación de la interzona requiere que en la región de los condrocitos en proliferación y el pericondrio la disminución de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Garciadiego-Cazares et al., 2004; Jacobson, 1997).

identificarse por cambios morfológicos incluyendo la fragmentación nuclear y del ADN, el ampolamiento de la membrana y formación de los cuerpos apoptóticos. El mecanismo de activación puede llevarse por dos vías. En la ruta extrínseca los mediadores son los receptores de muerte de la superfamilia de los TNFR. Mientras que la ruta intrínseca o autónoma se centra en la regulación a nivel mitocondrial. Los miembros de la familia BCL2 (Bax, Bak) actúan como factores pro-apoptóticos, que en su forma activa inducen la liberación del Citocromo C, Smac/Diablo, la proteasa de serina Omi/HtrA2, endonucleasa G (endoG) y AIF de la mitocondria. La liberación del Citocromo C al citoplasma permite su asociación con Apaf-1 y la pro-Caspasa9 formando el complejo del apoptosoma. El apoptosoma tiene la función de activar a la pro- Caspasa9 a Caspasa9, con lo que en cascada, se activan las Caspasas efectoras. AIF se transloca hacia el núcleo promoviendo la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN actuando de manera complementaria a las Caspasas (Hong et al., 2004).

Finalmente, las dos vías convergen en la activación de las proteasas conocidas como Caspasas. Estas proteasas se pueden dividir en dos grupos: Caspasas iniciadoras (Caspasa8, Caspasa9 y Caspasa12) las cuales, activan a las Caspasas efectoras (Caspasa3, Caspasa6 y Caspasa7), que son las responsables directas del desmantelamiento de las estructuras celulares (Nakanishi et al., 2001).

De acuerdo con la prueba de TUNEL y la activación de las Caspasas la muerte celular que se lleva a cabo en el interdigito de ratón y de pollo es de tipo apoptótica (García-Martínez et al., 1993; Nakanishi et al., 2001; Zuzarte-Luis et al., 2006). En el interdígito, la inhibición de las Caspasas 2, 3, 6 y 9 así como el inhibidor de Apaf1

reducen parcialmente la MCP (Chautan et al., 1999; Jacobsen et al., 1996). Los ratones mutantes en las Caspasas 1, 2, 3, 9 y 11 no muestran una supresión completa de la apoptosis por lo que puede ser que, las Caspasas mediante rutas distintas pueden llevar a la muerte de las células o también, puede coexistir un mecanismo alternativo e independiente de Caspasas mediado quizá por AIF (Kuida et al., 1998; Zuzarte-Luis et al., 2006).

La MCP en la extremidad de especies de dígitos libres es un mecanismo morfogénico que contornea las áreas pre y post axial y libera los dedos de las membranas interdigitales (Fallon and Cameron, 1977; Hurler et al., 1996). En el embrión de pollo, las zonas necróticas anterior (ZNA), necrótica posterior (ZNP) y la necrótica interdigital (ZNI) corresponden a regiones de muerte celular de tipo apoptótica y ahora pueden ser referidas como AAZ, PAZ y IAZ (Abarca-Buis et al., 2011). Mientras que en el ratón, las regiones de muerte celular son vistas más tardíamente comparado con el desarrollo del pollo, las células de la “foyer marginal” se encuentran en el margen de la AER y son parte del mesénquima de la región preaxial y post-axial. Estas áreas también son referidas como las Zonas Necróticas Anterior y Posterior, respectivamente (Milare, 1992). Defectos en la muerte celular, puede resultar en un cambio en el patrón digital como por ejemplo, un aumento o disminución en el número de dedos (polidactilias) o sindactilia (persistencia de la membrana interdigital) incluso, la combinación de ambos defectos.

En la extremidad posterior del embrión de pollo, la primera área de MCP es la ZNA alrededor del estadio 22HH. Después, en el estadio 23HH, se evidencia células positivas, en el parche opaco que está situado entre las condensaciones de cartílago de la tibia/fíbula. Entre los estadios 27-28HH, es posible detectar la MCP en la ZNP. Finalmente, entre los

estadios 29- 30HH, se observan células positivas en los interdígitos, desde el tercer interdígito, continuando hacia el segundo y el primer interdígito. La MCP alcanza su máxima detección en estadio 31HH (Fernández-Teran et al., 2006; Zuzarte-Luis et al., 2006) (Fig.7). Una vez superado este pico máximo, las células son eliminadas por células vecinas (fagocitos) y/o por macrófagos competentes (Hurle and Hinchcliffe, 1978).

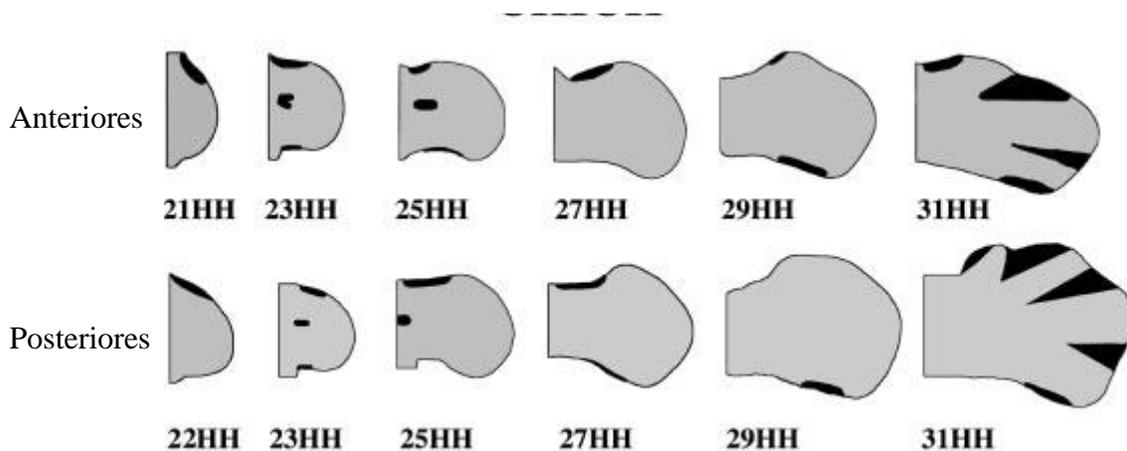


Figura7. Áreas de muerte celular, en la extremidad anterior (A) y posterior (B) en el pollo marcadas en color negro (Fernández-Teran et al., 2006)

BMP en la muerte celular interdigital

La localización de varios miembros de la familia de las BMPs coincide con las áreas de MCP de la extremidad. De esta manera, la expresión de *Bmp4* y *Bmp7* coinciden con las áreas anterior y posterior. Mientras que, la expresión *Bmp4*, *Bmp5* y *Bmp7* se observa en las áreas interdigitales. La exposición local por medio de implantación de perlas embebidas en BMP4, BMP5 o BMP7 puede inducir prematuramente MCP tanto en la región anterior como en el interdígito (Abarca-Buis et al., 2011; Ganan et al., 1996;

Zuzarte-Luis et al., 2004). Sin embargo, cuando la perla embebida en BMP se coloca dentro del contexto condrogénico es decir, en los dedos, se promueve un crecimiento exacerbado del cartílago (Macías et al., 1997). El efecto dual de las BMP puede deberse a los receptores. Se ha demostrado que, la expresión del receptor *BmpR1a* está localizada preferentemente en el mesénquima indiferenciado, mientras que la expresión de *BmpR1b* se encuentra en las condensaciones precondrogénicas. Aunque este argumento no es apoyado por el fenotipo de los animales con ganancia o pérdida de función de los receptores, ya que en ambos casos se afectan las condensaciones de cartílago y la muerte celular (Zou and Niswander, 1996; Zou et al., 1997). Adicionalmente, el ratón mutante para cada uno de los receptores no presenta alteraciones en la extremidad. Mientras que, el doble mutante *Bmpr1a/ Bmpr1b* genera condrodisplasia (Yoon et al., 2005). Lo que implica que ambos receptores tienen funciones en la MCP y en la condrogénesis.

Otra posibilidad de las causas de la función dual de BMP en el autópodo pudieran atribuirse a su distribución espacial. De acuerdo a esto, la actividad de BMP estaría siendo controlada ya sea por el proceso de condrogénesis o de la MCP. De esta manera, la aplicación de BMP en la punta del dedo induce la expresión de *Bmpr1b* y *Sox9* con lo cual se llega a la diferenciación. Mientras que, la colocación más distal de la perla en la ZP, lleva a la apoptosis, similar al resultado de colocar BMP en el interdígito. De esta manera las células que expresan *Sox9* y que además expresan Bmp serían susceptibles a la condrogénesis, mientras que las células que no expresen *Sox9* pero que si expresan Bmp presentan MCP (Merino et al., 1998; Montero et al., 2008). Adicionalmente, la respuesta diferencial de las células de la ZP a BMP puede estar condicionada a la regulación por otras vías de señalamiento. Un ejemplo, es el bloqueo de los receptores de FGF en el

interdígito que lleva a la inhibición de la muerte celular, esto contrasta con su actividad en la sobrevivencia celular. Finalmente, esto indica que la actividad de BMP no es suficiente para inducir la apoptosis interdigital (Montero et al., 2001; Pajni-Underwood et al., 2007).

La MCP mediada por BMP se favorece por un conjunto de factores. Éstos coinciden con las áreas AAZ, PAZ y IAZ y son regulados positivamente por BMPs, entre estos, los que destacan son los factores de transcripción *Msx*. *Msx1* y *Mx2* se expresan en las áreas de MCP superponiéndose con las áreas de expresión de *Bmps* y además pueden ser inducidos por BMP4. Los mutantes *talpid* y *diplopodia* que se caracterizan por presentar dedos extras, carecen de la expresión de *Msx2* en las zonas anterior y posterior del autópodo (Coelho et al., 1993). De manera interesante, en el embrión de pato la expresión restringida de *Msx2* a la región distal, correlaciona con la MCP que se lleva a cabo solo en dicha región. Se ha propuesto que, su función es sensibilizar a las células para que respondan al estímulo de BMP. Por sí solos *Msx1* y *Msx2* no son capaces de inducir la MCP.

Ácido Retinoico (AR)

El ratón mutante *Hammertoe* presenta muerte celular y sindactilia, sus defectos pueden ser rescatados si en la dieta de las ratonas preñadas se incluye vitamina A (Ahuja et al., 1997). Durante el desarrollo, el metabolismo de la vitamina A (Retinol) lleva a la síntesis del AR (ácido retinoico). El AR participa en la morfogénesis, diferenciación, crecimiento celular, la homeostasis tisular, organogénesis y la muerte celular (Mark et al., 2009). El mayor componente detectado con actividad biológica es el all-trans-retinoic acid

(ATRA) producto del metabolismo realizado por la enzima RALDH2 durante la embriogénesis (Pennimpe et al.,2010)

En detalle, el metabolismo del AR se lleva a cabo en el citosol. El primer paso es la oxidación reversible hacia retinaldehído y las enzimas ADHs (aldehyde dehydrogenases) y SDR (Short-chain Dehydrogenases) que catalizan la reacción de forma reversible. El segundo paso, involucra la oxidación irreversible del retinaldehído a AR y las enzimas que realizan este paso son las RALDHs (Retinaldehyde Dehydrogenases) (Duester et al., 2003; Molotkov and Duester, 2003). El señalamiento del AR se da a través de dos familias de receptores nucleares: la familia RAR (Retinoic Acid Receptor) con tres isotipos ($RAR\alpha$, $RAR\beta$ y $RAR\gamma$) y la familia de los receptores de retinoides X (RXR) también con tres isotipos ($RXR\alpha$, $RXR\beta$ y $RXR\gamma$), que en su funcionamiento pueden formar heterodímeros RAR/RXR. Los receptores AR actúan como reguladores transcripcionales y son inducibles por unión al ligando. Una vez formado el complejo ligando-receptor, éste actúa como un complejo regulador de la transcripción al unirse a RARE (Retinoic Acid Response Elements). Sin embargo, los RXR también pueden actuar como homodímeros e inducir la transcripción vía los elementos de respuesta a retinoides X (DR-1) o como heterodímeros en los que participan receptores nucleares de diferentes familias (Idres et al., 2002). Durante la formación de los dígitos se encuentran, los componentes de las vías de señalamiento del AR, incluyendo a *Raldh2*, los receptores *RAR\beta*, *RAR\gamma* así como *Cyp26b1* que codifica para la enzima responsable de la inactivación del AR. En el ratón, la doble mutación *RAR\beta/RAR\gamma* afecta la apoptosis interdigital y produce sindactilia en el estadio 15.5. Resultado que indica la participación del AR en la muerte celular interdigital (Dupe et al., 1999; Ghyselinck et al., 1997). La expresión de *Raldh2* así como de *RAR\beta* se localiza

en el mesénquima interdigital, mientras que *Cyp 26b1* se expresa en los dígitos. Podría considerarse que limita la acción del AR a las regiones interdigitales (Zhao et al., 2010). En el embrión de pollo, los tratamientos locales con all-trans-AR, induce la muerte celular y regresión de la AER de manera prematura. Los antagonistas del AR producen sindactilia en ratón y en el pollo. En algunos casos, con la formación de un dedo en la membrana interdigital, lo que indica que adicionalmente, el AR tiene una actividad anticondrogénica en las áreas interdigitales (Hernández-Martínez et al., 2009; Rodríguez-León et al., 1999). En el interdígito de pollo, el doble tratamiento AR/NOGGIN resulta en la inhibición de la muerte celular. El tratamiento simple con AR induce a *Bmp7* con inducción posterior de los genes *Msx1* y *Msx2* (Dupe et al., 1999; Rodríguez-León et al., 1999). Estos resultados demuestran que la muerte celular interdigital inducida por el AR es mediada por BMP (Rodríguez-León et al., 1999).

El antagonismo observado entre el AR proveniente del mesodermo y FGF del ectodermo, podrían explicar parte del mecanismo de la regresión interdigital. El AR al actuar negativamente sobre la vía de señalamiento FGF proveniente de la AER se ve interrumpida la inducción de la expresión de *Fgfr1* y la fosforilación de Erk1/2 afectando la supervivencia de las células de la región distal. En contraste, FGF mantiene al tejido interdigital, al inhibir la expresión de *Raldh2* e incrementar la expresión de *Cyp26b1* involucrados en la síntesis y degradación del AR, respectivamente (Hernández-Martínez et al., 2009).

Diferenciación del mesénquima distal: patrón digital-interdigital

Las células de la ZP expresan *Fgf10*, *Mkp3*, receptores para Fgf, *Msx2*, *Msx1*, los cuales en su conjunto, se han involucrado con su estado no diferenciado. La diferenciación, se da en la región proximal de la ZP y es positiva a la expresión de *Sox9* que se observa ampliamente en tanto en las áreas presuntivas digitales como interdigitales. Después se observa únicamente en las áreas que prefiguran los dedos. Esto sugiere, la existencia de un componente que limita en las áreas aledañas a los dedos, la permanente expresión de *Sox9*. Esta idea es sustentada por la sensibilidad del tejido interdigital hacia las señales condrogénicas. En el interdígito, el factor TGF β promueve la formación de un dedo ectópico con la inducción de *Sox9* en tan solo 30 minutos, al mismo tiempo, la expresión de los factores que median la muerte celular *Bmp4*, *msx1* y *msx2* son inhibidos, indicando que TGF β evita la muerte interdigital que ocurre normalmente y promueve la condrogénesis. El antagonismo entre los factores condrogénicos y de los de inducción de muerte celular podrían definir las áreas interdigitales y del cartílago a zonas particulares (Chimal-Monroy et al., 2003; Ganan et al., 1996; Hurler et al., 1989; Ros et al., 1997). El AR cumple una función antagónica a la condrogénesis, pues se ha demostrado que la inhibición del AR en el interdígito inhibe la MCP y lo que lleva a la formación de un cartílago ectópico, lo que indica una actividad de inhibición de la condrogénesis por parte del AR y activador de la MCP (Chimal-Monroy et al.; Rodríguez-León et al., 1999). Esto aporta evidencias de que las células del interdígito son muy maleables, dependientes de la presencia de una o varias moléculas que las lleve hacia un destino en particular o hacia otro. El balance de estas señales podría establecer el patrón digital. Sin embargo, hasta el momento, el establecimiento del patrón digital es un enigma.

Factores de transcripción

Los factores de transcripción tienen la función de regular la expresión génica, activando o reprimiendo la transcripción. Durante el desarrollo embrionario, su actividad o inactividad desencadena una respuesta hacia procesos como la proliferación, la diferenciación, la muerte o el crecimiento celular. También podemos encontrar a factores de transcripción con una alta capacidad de regulación al actuar como decodificadores de programas genéticos específicos permitiendo la organización y la identidad celular, es decir son factores encargados de la formación de patrones al permitir la división o subdivisión de grandes territorios en otros más pequeños en los que las células tienen funciones con características únicas y es en este contexto que los genes *Iroquois(Irx, Iro)* realizan sus funciones.

Proteínas con homeodominio

Los genes Homeobox presentan en su secuencia de ADN una región conservada de 183 pb que codifica en la proteína el homeodominio equivalente a 60 aa y es el sitio de unión al ADN que le confiere la actividad de regulador transcripcional (Cillo et al., 2001; Gehring and Hiromi, 1986). En la escala filogenética están ampliamente distribuidos tanto en levaduras, animales y plantas que se han examinado hasta el momento. A los genes homeóticos se les han atribuido funciones importantes en la embriogénesis. La primera función descrita de genes con homeodominio fue en el control de genes que regulan el plan corporal, realizado por los homeóticos. Sin embargo, muchos genes homeóticos no son

genes *hox*, es decir el homeobox es la secuencia motivo mientras que homeótico, es una descripción funcional para los genes que causan transformaciones homeóticas (Heffer and Pick, 2013).

Las proteínas con homeodominio son indispensables en la organización de las estructuras. Por ejemplo, la posición de nuestros brazos y piernas en sitios adecuados a lo largo del eje corporal, que le permiten cumplir su función. Además, el esqueleto de la extremidad se encuentra ordenado en estructuras proximales, mediales y distales.

Factores de transcripción Iroquois (Irx)

Entre los diversos tipos de homeodominio, los factores *Irx* se han clasificado dentro de la superfamilia TALE (three amino acid loop extensión por sus siglas del inglés). Son genes con un homeodominio atípico, es decir tienen más o menos de 60 aminoácidos. El análisis de la estructura de la proteína muestra que los aminoácidos extra son acomodados entre la hélice 1 y hélice 2. Entre los miembros de este grupo se encuentran el protooncogen PBX1, los factores de transcripción TGIF, MEIS1, PBC, NOX y el complejo de los IROQUOIS (*c-Iro*) (Burglin, 1997).

Los genes *Iroquois (Irx)* se identificaron en *Drosophila*, en el proceso de formación de patrones de órganos sensoriales externos como son las cerdas y los pelos sensoriales (Dambly-Chaudiere and Leyns, 1992; Leyns et al., 1996). *Araucan (Irx1)* fue el primero de tres genes relacionados (*araucan*, *caupolican* y *mirror*) y su mutación causa la pérdida de

las cerdas laterales del mesotórax dorsal en *Drosophila*. La carencia de cerdas se debe a la supresión de los genes proneurales Achaete- Scute que se expresan en el mesotórax dorsal, dando como resultado la falta de las células de los órganos sensoriales (Cavodeassi et al., 2001).

El *c-Iro* no está dentro de la definición de los genes homeóticos clásicos. Sin embargo, por su función pertenecen a la clase de genes que especifican territorios. De esta manera participan en la formación del prepatrón y en la generación de la identidad durante el desarrollo. Su función recae en su patrón espacial y temporal restringido y es dependiente de otros factores de transcripción de tipo prepatrón (de la Calle-Mustienes et al., 2005; Peters et al., 2000). En la mosca la expresión restringida de *c-Iro* en la región proximal del disco imagal del ala contribuye a la subdivisión del territorio, al especificar la formación del notum versus el notum medial, su expresión restringida es debida a la cooperación entre la señalización EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) y DPP (Decapentaplegic) (Letizia et al., 2007).

Se asume que en mamíferos, un evento de duplicación afectó positivamente al grupo ancestral de los *Irx*. De esta manera, se tiene al grupo A (*Irx1*, *Irx2*, *Irx4*) y el grupo B (*Irx3*, *Irx5*, *Irx6*). Los pares *Irx1/Irx2*, *Irx3/Irx5* tienen patrones de expresión similares, mientras que la expresión del tercer gen *Irx4* o *Irx6* es generalmente más divergente. En algunos tejidos, los genes de un grupo o incluso de ambos grupos se expresan de manera idéntica (Alarcon et al., 2008; Bellefroid et al., 1998; Bosse et al., 1997; Garriock et al., 2001; Gomez-Skarmeta et al., 1998). En el caso de vertebrados, como el pez Cebra, se han encontrado 11 genes que están agrupados: *IrxAa* (*Irx1a*, *2a*, *4a*) *Irx1 Ab* (*Irx1b*, *4b*) *Irx Ba*

(*Irx3a*, *5a*, *6a*) e *Irx1 Bb* (*Irx3b*, *5b*) y un gen aislado *zIrx7*, similar al caso de mamíferos, la duplicación parece ser el origen de los 4 grupos (McDonald et al., 2010). En este estudio fueron evaluados los genes *Irx1* e *Irx2* miembros del grupo A.

En *Xenopus*, para la inducción del tejido neural se requiere de la actividad de antagonistas de BMP4. Sin embargo, se ha visto que el señalamiento Wnt, por sí solo puede inducir el tejido neural, incluso en ausencia de antagonistas de BMP. En este contexto, se sugiere que Wnt induce a *Xiro1* que actúa como represor en este sistema y éste sería el mediador de la inhibición de BMP4 en el ectodermo dorsal (Glavic et al., 2001). Durante la organogénesis los *Irxs* definen los límites entre dos regiones. Por ejemplo, en la creiente cardíaca *Irx4* define los límites entre la región antero-posterior. De igual manera, en el pulmón *Irx1*, 2, 3 y 5 se expresan en el área distal. El tratamiento con oligos morfolidos en células de pulmón, da como resultado la formación de túbulos proximales en la región que daría lugar a la región distal (van Tuyl et al., 2006). En el cerebro posterior, la organización del cerebelo está dada por FGF8. En el inicio de su formación, la expresión de *Irx2* coincide con la región del labio rómbico. Por lo que, se examinó el efecto de la expresión ectópica de *Fgf8a* y de *Irx2* de manera individual en la región del cerebro medio, estos experimentos no produjeron cambios en la organización del romboencéfalo. Sin embargo, cuando se expresa *Irx2* en conjunto con *Fgf8a* se produce la formación ectópica del cerebelo (Matsumoto et al., 2004).

En la formación de las extremidades de ratón, pollo e incluso en las de humano, los dos grupos *Irx* se expresan, lo que demuestra la conservación de estos genes a lo largo de la escala evolutiva. Generalmente, se ha demostrado que la expresión del grupo A se localiza

preferentemente en la región digital, en las regiones del pericondrio y de las articulaciones, mientras que el grupo B está localizado en las áreas interdigitales (Houweling et al., 2001; Lebel et al., 2003; McDonald et al.; Zulch et al., 2001). Aunque, su función se desconoce en la formación de las extremidades, el ratón mutante *Ft* (*Fused toes*) da una idea de su posible participación, en este ratón, el grupo B de los *Irx* no está presente además de los genes *Fto*, *Ftm* y *Fts*. Los animales homocigotos mueren entre los estadios 12 y 15dpc pero se observa en sus extremidades condensaciones positivas a *Sox9* en el eje dorso-ventral. Los animales heterocigotos presentan sindactilias de las extremidades anteriores y la formación de los dedos se ve afectada por un aumento en la muerte celular en la zona anterior-distal así como cambios en la morfología de la AER (Grotewold and Ruther, 2002; Heymer and Ruther, 1999). Esto revela una posible participación en los procesos de condrogénesis y de muerte celular.

JUSTIFICACIÓN

Considerando que los factores de transcripción *Irx*, tienen gran relevancia por su conservación entre las especies, además de que el patrón de expresión de los genes *Irx1* y *Irx2* (*Irx1/2*) se observa en las áreas presuntivas digitales, en el pericondrio y en las articulaciones de la extremidad en varios organismos modelo, nos planteamos la posibilidad de que puedan participar activamente en los procesos que llevan a la formación de los dígitos y a la eliminación de las áreas interdigitales, pudiendo ser regulados por los eventos condrogénicos y de MCP durante la formación del autópodo en la extremidad embrionaria del pollo.

HIPÓTESIS

Si la expresión de los genes *Irx1* e *Irx2* (*Irx1/2*) en los dedos y en los interdigitos son dependientes del proceso condrogénico éstos serán regulados positivamente por TGF β mientras que el AR inhibirá su expresión.

OBJETIVOS

- Obtener el patrón de expresión de *Irx1* e *Irx2* en los diferentes estadios embrionarios
- Conocer la regulación de *Irx1* e *Irx2* por el factor condrogénico TGF β durante la formación de los dedos y en las áreas interdigitales
- Conocer la regulación de *Irx1* e *Irx2* por los factores involucrados en la muerte celular (AR y BMP7) en las regiones interdigitales

MATERIALES y METODOS

Preparación de factores

Se utilizaron perlas de heparina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y de affigel (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA) para cualquiera de los siguientes factores: TGF β (15, 25, 50 y 75 ng/ μ l), BMP (1 μ g/ μ l), NOGGIN (1 μ g / μ l). Todas estas proteínas se obtuvieron de la compañía Peprotech, México, México. De la misma manera se utilizaron perlas de intercambio Iónico AGI-X2 (Sigma-Aldrich) para el factor AR (5mg/ml) (Sigma-Aldrich) y para el inhibidor de los receptores de FGF (SU5402 a una concentración de 20mM) que se incubaron protegidos de la luz. Los factores fueron incubados por 1 hora en cámara húmeda.

Manipulación del embrión

Se emplearon embriones de pollo (*Gallus gallus*) white Leghorn (ALPES, Puebla, México) incubados a 37°C y 70% de humedad. Los estadios embrionarios del desarrollo del pollo fueron descritos previamente por Hamburger y Hamilton (HH) (Hamburger and Hamilton, 1992) y de acuerdo a esta tabla se utilizaron los embriones entre los estadios 23-31HH.

Para manipular el embrión, el huevo se abrió y se retiraron las membranas externas. Se abrió el amnios para exponer la extremidad posterior del embrión entre los estadios 23-31HH. En la extremidad derecha se colocó una perla embebida en cualquiera de los siguientes factores: TGF β , AR, FGF, BMP, NOGGIN y como control se utilizaron perlas con PBS. Las perlas embebidas en las proteínas o en los fármacos reguladores de la muerte celular y diferenciación condrogénica se colocaron en el tercer interdígito y en la punta del tercer dedo en los estadios 27HH y 29HH, mientras que los factores FGF8 y FGF10 y el inhibidor SU5402 se colocaron únicamente en estadio 24HH en la región posterior del autópodo. Una vez realizado el tratamiento en el embrión, se selló el cascarón con cinta adhesiva y se regresó el huevo al incubador. Los tratamientos tuvieron una duración de 2, 4, 8, 12, 24 h. Transcurrido el tiempo, los embriones se procesaron de acuerdo con las especificaciones para cada una de las siguientes técnicas: Hibridación in situ, inmunofluorescencia de caspasa-3 activa, tinción de rojo neutro y tinción de azul alciano.

RT-PCR, Sondas e Hibridación In Situ

Se aisló RNA de los estadios 26-30HH mediante el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que fue utilizado para obtener cDNA por medio de retrotranscripción reversa con el Kit First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) usando el oligo (dT) primer de acuerdo con el protocolo de fabricante (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Los siguientes oligos se usaron para amplificar *Irx1* (AJ238354), oligos forward 5'-GCTCAATGAACACCGCAAG-3' y el oligo reverse 5'-GTTGTGGTGA-GTGGCATGGT-3'. El fragmento de 757pb se clonó en el vector pGEM por medio del kit T-easy pGEM Vector System I (Promega, Madison, WI, USA). El fragmento de *Irx2* fue descrito previamente (Goriely et al., 1999). Se realizaron comparaciones de las secuencias para verificar la autenticidad de los fragmentos de *Irx1* e *Irx2* además se corroboró que no presentaran el homebox ni a la región Iro, de esta manera se evitó la unión inespecífica de la sonda. Las sondas de *Bmp7*, *Sox9*, y *Colagena II* (*ColII*), *Gdf5* se describieron en (Chimal-Monroy et al., 2003) y WNT9a fue donado generosamente por el laboratorio del Dr. Tabin. Las sondas utilizadas para hibridación *in situ* en embrión completo se marcaron con UTP-digoxigenin (Roche). De acuerdo al protocolo previamente descrito (Ganan et al., 1998) para la hibridación *in situ*, las muestras se fijaron en 4% de paraformaldehído (PFA) y se deshidrataron en gradientes de metanol/PBS, para volverse a hidratar hasta PBT (Phosphate Buffer Saline y Tween 20 0.1%). Posteriormente se trataron con 60µg/ml Proteínasa K por 25 minutos para *Irx1*, *Irx2*, *Gdf5*, *Wnt9a*, *Autotaxina* y *Col II* a 21°C; y 65 µg/ml Proteínasa K por 25 minutos a 25°C para *Sox9*. Las sondas se diluyeron en amortiguador de hibridación y se colocaron a

los embriones a 68°C. Los lavados post-hibridación se realizaron a 70°C. El marcaje se observó con el substrato para la fosfatasa alcalina BM purple (Roche Applied Science).

Tinción de muerte celular con Rojo Neutro y Tinción de cartílago con Azul Alciano

En la tinción de rojo neutro, las extremidades obtenidas se lavaron en PBS frío y se metieron en una solución de 0.2% de rojo neutro/PBS. Una vez observada la tonalidad deseada, las extremidades se fijaron en una solución de PFA al 4% /CaCl₂ al 1% (pH7) y después de 24 horas se deshidrataron en isopropanol y se aclararon en xilol para su documentación (Ganan et al., 1996).

En la tinción de cartílago las extremidades se lavaron en PBS por 10 minutos, se fijaron en etanol seguido de acetona y se tiñeron en una solución de 0.3% azul alciano/Alizarina roja al 0.1% por 24 horas en cada solución. Las muestras se lavaron dos veces por diez minutos con agua y posteriormente se trataron en una solución de 1% KOH/20% glicerol. Las tinciones fueron almacenadas en 50% glicerol/50% etanol para su documentación.

Inmunofluorescencia y microscopia confocal

Se evaluó la apoptosis en las extremidades entre los estadios 24-30HH, por medio de la presencia de Caspasa-3 activa. Para lo cual, las muestras se fijaron en PFA y se incluyeron en sacarosa 20% /PBS por 24hrs y después en sacarosa 30%/PBS en donde se almacenaron hasta su procesamiento. Las muestras se cortaron en rebanadas de 50 micras

en criostato. Se realizaron lavados con solución de PBS albúmina sérica al 1% y después se agregó solución de bloqueo (10% de suero de cabra en PBS) más tritón X-100 al 0.3%. Se colocó el anticuerpo primario anti Caspasa-3 activa (Promega) en una dilución adecuada en solución de bloqueo durante toda la noche a 4° C. Se retiró el anticuerpo primario y se lavó con una solución de PBS albúmina al 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario en una dilución 1:500 en PBS con 0.1% de BSA. Por último se tiñeron los núcleos en azul con DAPI y las muestras se fotografiaron en el microscopio confocal DSU, Olympus.

RESULTADOS

*Expresión de *Irx1* e *Irx2* (*Irx1/2*) y su correlación con los eventos de condrogénesis, y de muerte celular interdigital.*

De acuerdo a la expresión de *Irx1* e *Irx2* (*Irx1/2*) reportada en el trabajo de McDonald (2010). Estos genes se localizan en los dígitos, en el pericondrio y en las articulaciones por lo que son candidatos para su estudio en los eventos que llevan a la condrogénesis. Como parte del primer objetivo, en este trabajo se corroboró por medio de hibridación *in situ*, el patrón de expresión ya descrito. Se utilizaron extremidades posteriores de pollo entre los estadíos 24 y 31HH. Se observó que ambos son exclusivos del autópodo y son coordinadamente expresados desde la región posterior hacia la región anterior, iniciando en 24HH y hasta 31HH. Los sitios de expresión corresponden a los dígitos, las articulaciones y del pericondrio de los dedos (Fig. 9A-N). Realizamos una comparación entre *Sox9* e *Irx1/2*. Los 3 genes son observados en las prospectivas zonas digitales en los estadíos 24 y 26HH. Sin embargo, mientras que *Sox9* en el estadío 27HH

se encuentra en las regiones presuntivas de los dedos, *Irx1/2* se observan disminuidos de estas regiones. Adicionalmente, con la formación del interdígito son expresados. En estadio 28HH, la expresión de *Irx1/2* es muy evidente en los interdigitos, mientras que en los dedos, la expresión se restringe únicamente a alrededor de las condensaciones digitales (pericondrio) y las articulaciones. En estadio 29HH, en el interdígito se observó que disminuye su expresión. En los estadios 30 y 31HH, se observó el mismo efecto de disminución pero ahora, en el segundo interdígito y que continúa hacia el primero. Previamente, se ha reportado cuales son los estadios en los que se lleva a cabo la regresión de los interdigitos, esto mediante el colorante vital rojo neutro o con un marcador más preciso como es el TUNEL (Fernandez-Teran et al., 2006). Con ambas pruebas se mostró que los interdigitos son positivos al marcaje. Este inicia en el tercer interdígito en estadio 29HH, y gradualmente entre los estadios 30 y 31HH, la marca se observa en el segundo y en el primer interdígito. Nosotros, realizamos el seguimiento de la MCP con Caspasa 3, que igual a las pruebas antes mencionadas detectan células positivas desde el estadio 29HH. De esta manera, se observó que las áreas positivas a Caspasa 3 son carentes de la expresión interdigital de *Irx1/2* (Fig.9D-G, K-N, R-U).

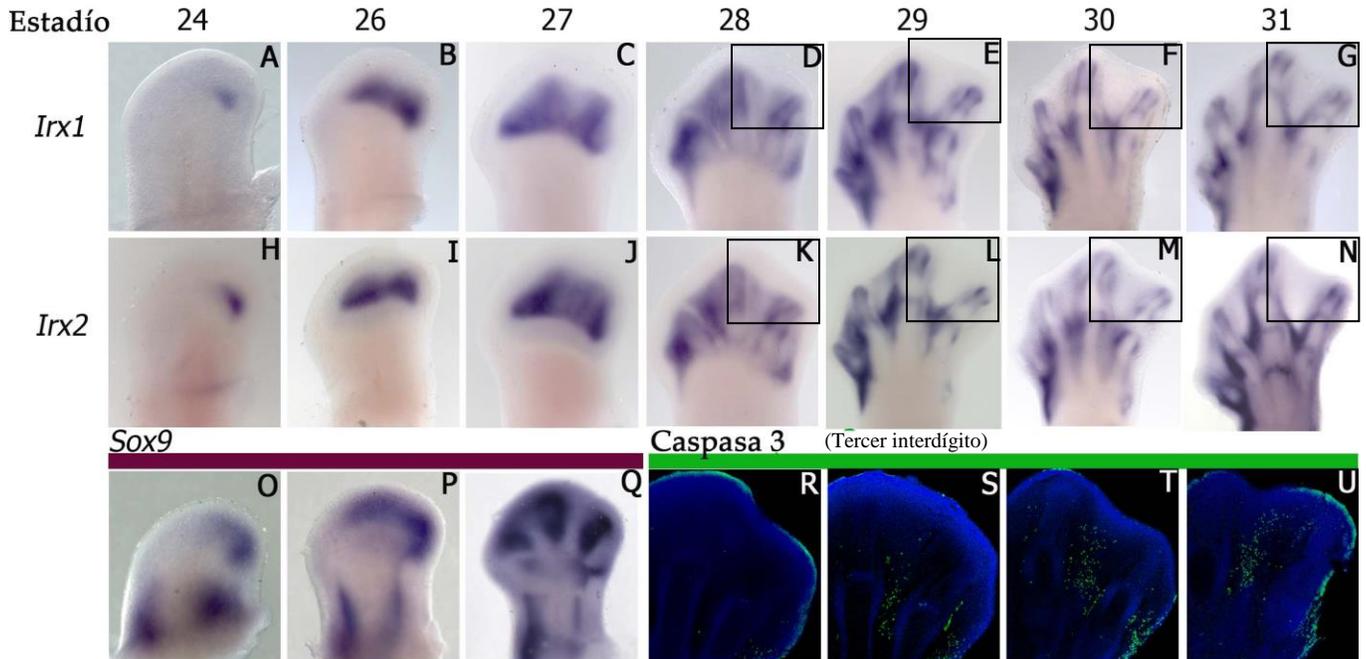


Figura9. Expresión de los genes *Irx1/2* es regulada negativamente en el tejido interdigital y coincide con el inicio de la muerte celular. Hibridación *in situ* de *Irx1* (A-G) e *Irx2* (H-N) en los estadios 24HH (A, H), 26HH (B, I), 27HH (C, J), 28HH (D, K), 29HH (E, L), 30HH (F, M) y 31HH (G, N), respectivamente. Los genes *Irx1* e *Irx2* son expresados coordinadamente en los tejidos del interdígito, en los primordios digitales, articulaciones. Se muestra la expresión de *Sox9* en estadios 24HH (O), 26HH (P) y 27HH (Q) para comparar la expresión de *Irx1/2* en los estadios 24HH, 26HH y 27HH. La expresión de *Irx1/2* (D-G y K-N) disminuye del tercer interdígito, mientras que la presencia de células positivas a Caspasa 3 se evidencia en las zonas carentes de ellos (verde) 28HH (R), 29HH (S), 30HH (T) y 31HH (U). Los cortes fueron realizados a 50 μ m. En las fotografías D, K, E, L, F, M, G, N se colocaron cuadros indicando los sitios en donde fue analizada la actividad de la Caspasa 3 activa (R y U). El color rojo propio de Cy3 fue cambiado a color verde con el fin de obtener un mejor contraste de las imágenes.

*El AR regula negativamente la expresión de *Irx1/2* antes de la MCP*

En trabajos previos de Rodríguez-León y col (1999) se ha demostrado la actividad del AR y BMP7 como potentes promotores de la MCP, en la regresión interdigital. Con la idea de conocer si la restricción de la expresión de *Irx1/2* de los interdigitos, se asocia a la MCP, se evaluó su regulación ante los factores inductores de la regresión interdigital. Para

lo cual se colocaron perlas impregnadas con los factores pro-apoptóticos AR o BMP7 en el tercer interdígito, en estadio 27HH. Se observó mediante hibridación *in situ*, la regulación de la expresión de los *Irx*. El tratamiento con AR produjo la inhibición de la expresión de *Irx1/2* esto fue visto desde las 8 h post-tratamiento (Fig.10A, B); mientras, el tejido fue positivo a Caspasa 3, hasta las 12 h (Fig.10 D). Estos resultados indican que la regulación negativa de *Irx1/2* debida al tratamiento de AR antecede a la muerte celular detectada por Caspasa 3. Adicionalmente, los controles muestran que no fueron observadas células positivas a Caspasa 3 con perlas bañadas en PBS que fueron colocadas en el interdígito en idénticas condiciones a como se mencionó anteriormente (Fig.10 E).

En la regresión del interdígito, BMP7 es mediador del AR (Rodríguez-León and et al., 1999). Con el objetivo de conocer si la inhibición causada por AR esta mediada por BMP7, se realizaron tratamientos en el interdígito con BMP7, así como con su antagonista, NOGGIN. Estos tratamientos no cambiaron la expresión de los *Irx*, en los tiempos aquí evaluados (Fig.10F-G, K-L). Estos resultados fueron corroborados al observarse que BMP7 induce MCP a las 12 h (Fig.10H-J) mientras que NOGGIN la inhibe (Fig.10 M-N). Adicionalmente, otro tratamiento consistió en colocar dos perlas simultáneamente, una embebida AR y otra con NOGGIN por 8 h en el interdígito. Con esto, se observó que la expresión de *Irx1/2* se mantiene inhibida (Fig.10 O-P) y también, este doble tratamiento afectó a la muerte celular interdigital en los tiempos evaluados de 8 y 12 h (Fig.10 Q-R). Estos resultados confirman que el AR no necesita de la vía de BMP7 para regular negativamente a *Irx1/2*.

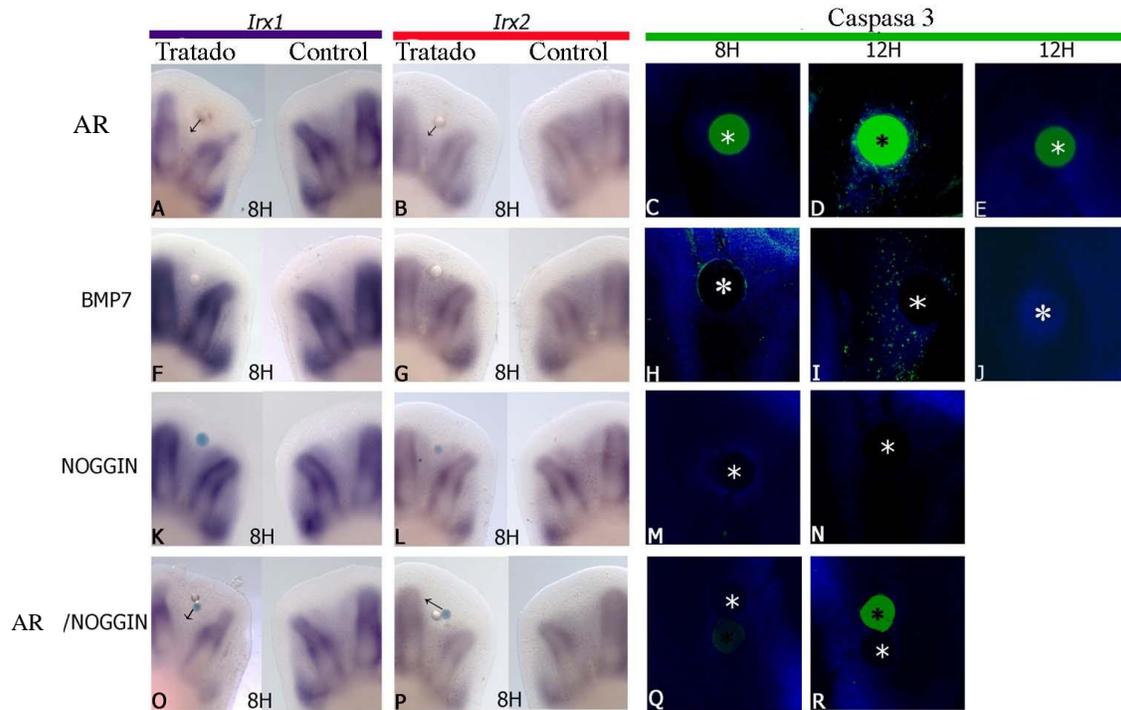


Figura 10. Previo a la MCP, el AR independiente de BMP7, inhibe la expresión de *Irx1/2*. La expresión de *Irx1/2* en estadio 27HH en las extremidades posteriores del pollo después del tratamiento por 8 h en el interdígito con AR (A, B), BMP7 (F, G), NOGGIN (K, L) y el doble tratamiento AR/NOGGIN (O, P). La expresión de *Irx1/2* es inhibida por AR pero no por BMP7. La muerte celular del tercer interdígito fue evaluada con Caspasa 3 (verde). El AR no induce la MCP a las 8 h pero si inhibe a *Irx1/2* (A, B, C), sin embargo, la MCP fue evidente a las 12 h (D). El tratamiento con BMP7 produjo poca marca de Caspasa3 y no provocó cambios en *Irx1/2* a las 8 h (H) siendo la MCP evidente a las 12 h (I). El tratamiento con NOGGIN (M, N) y el doble tratamiento AR/NOGGIN (Q, R) inhiben la muerte celular mediada por BMP7 (M, N y Q, R), sin embargo, solo el doble tratamiento inhibió a *Irx1/2* (K, L y O, P). Perlas bañadas en PBS sin AR o sin BMP7 no indujeron muerte celular (E, J). Las muestras experimentales en A, B, F, G, K, L, O, P se presentan en el lado izquierdo mientras que los controles están del lado derecho. Las flechas negras indican las áreas de inhibición de *Irx1/2*. Se observó autofluorescencia con las perlas de intercambio iónico que fueron utilizadas para el tratamiento de AR. El color rojo natural del Cy3 usado para detectar Caspasa 3 activa fue cambiado a verde para mejorar las imágenes.

El AR regula negativamente a Irx1 e Irx2 en la punta de los dedos

Como se ha mencionado, los *Irx1/2* se expresan en las áreas condrogénicas (Fig.9A-N). El AR tiene una función anticondrogénica cuando se coloca en la punta del dedo, además de que en las células de la región de la ZP produce su muerte (Rodríguez-León et al., 1999). Realizamos tratamientos de AR en la punta del dedo, con el fin de conocer la relación entre la expresión de *Irx1/2* con el proceso condrogénico. Los tratamientos con AR inhibieron la expresión del marcador condrogénico *Sox9* desde las 4 h (Fig.11A), siendo la MCP evidente a las 12 h, evaluado con la presencia de Caspasa 3 (Fig.11B, C). Asimismo *Irx1/2*, son rápidamente regulados de forma negativa desde las 4 h. Esta rápida inhibición de *Irx* dio pie a la idea de que hay una relación de los genes *Irx1/2* en la condrogénesis (Fig.11D-E).



Figura 11. El AR inhibe la expresión de *Irx1/2* en la punta de los dedos. La expresión de *Sox9* en las extremidades posteriores en estadio 27HH después de las 4 h de tratamiento con AR (A). La presencia de Caspasa 3 a las 4 h o 12 h después del tratamiento con AR en la punta del dedo (B, C). La expresión de *Irx1/2* después de 4 h de tratamiento con AR en 29HH (D, E). La inhibición de *Irx1/2* es previa a la presencia de Caspasa 3 activa. Las flechas indican la posición de la perla. Se observó autofluorescencia con las perlas de intercambio iónico utilizadas para el tratamiento de AR. El color rojo natural del Cy3 usado para detectar Caspasa 3 activa fue cambiado a verde para mejorar las imágenes.

TGFβ Regula la expresión de Irx1/2 durante la Condrogénesis

TGFβ y el AR tienen funciones antagónicas en la condrogénesis y en la MCP (Chimal-Monroy et al., 2011). De acuerdo a la regulación de *Sox9* y de *Irx1/2* observada con el tratamiento de AR. Se evaluó la capacidad de TGFβ para inducir la expresión de *Irx1/2* en la región del interdígito. Un primer acercamiento consistió en colocar TGFβ en estadio 28HH, que aún presentan a *Irx1/2* en los interdigitos. Para lo cual, se bañaron perlas en el factor TGFβ y se colocaron en el interdígito, esto dio como resultado la inhibición de la expresión de *Irx1/2* desde las 4 h, mientras que el marcador condrogénico *Sox9* fue ampliamente inducido (Fig.12 A, B, C). Adicionalmente, se realizó el mismo tratamiento pero en este caso en estadio 29HH, que tiene dos características; la ausencia de la expresión de *Irx1/2* en el tercer interdígito y además, en este estadio TGFβ puede inducir a las células interdigitales a formar un dedo ectópico. De acuerdo a esto, la expresión de *Irx1* se observó a las 21 h mientras que *Irx2* a las 19 h (Fig.12 G y H). Si se compara, la expresión de *Irx1/2* con *Sox9* se observa que el área condrogénica positiva a *Sox9* (Fig.12 D) carece de la expresión de *Irx1/2*, los cuales se observaron alrededor del cartílago formado, expresándose en la zona que corresponde al pericondrio (Fig.12 G y H). La formación del dedo ectópico ocurre con la expresión de varios marcadores (Fig.12 D-E) que incluyen a *Sox9* y *Col II* los cuales se indujeron a los 30 minutos y 16 h respectivamente, como previamente se publicó (Chimal-Monroy et al., 2003). La colocación de perlas de PBS en el espacio interdigital no produce dedos ectópicos. Estos resultados en su conjunto indican

que, *Irx1/2* no son necesarios para inducir la condrogénesis, sin embargo el proceso condrogénico puede inducir su expresión en los bordes del cartílago.

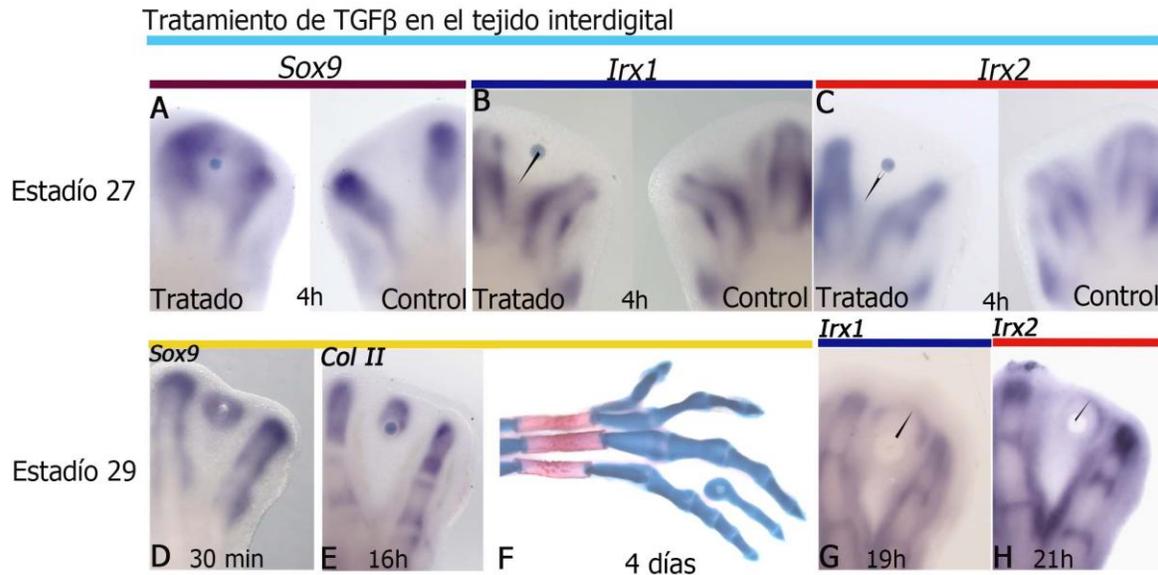


Figura 12. TGFβ regula a *Irx1/2* en una manera estadio-dependiente en el tejido interdigital. La expresión de *Sox9* y de *Irx1/2* en el interdígito, después de 4 H de tratamiento con TGFβ en estadio 27HH (A, B y C). Tratamiento de TGFβ en el área interdigital en estadio 29HH y la regulación de *Sox9* a los 30 min (D) *Col II* a las 16 h (E) *Irx1* a las 19 h (G) e *Irx2* a las 21 h (D). Un dedo ectópico fue formado después de 4 días del tratamiento con TGFβ (F).

Concentraciones de TGF-β modulan la expresión de Irx1/2

De acuerdo a los resultados observados en este trabajo, TGFβ puede inducir la expresión de *Irx1/2* en el borde del cartílago. Decidimos evaluar si TGFβ es necesario para establecer la frontera de la expresión de *Irx1/2*. Para esto realizamos tratamientos de TGFβ a concentraciones de 12.5, 15, 25, 50, 75 ng/μl, por 21 h en el tejido interdigital. Se encontró que, la menor concentración de TGFβ tiene una menor capacidad de inducir la condrogénesis, mientras que, la mayor concentración produce una mayor área condrogénica.

Se encontró que la expresión de *Irx1/2* se observa siempre en el límite del área condrogénica y es dependiente de la capacidad de TGFβ para promover la condrogénesis. Entre mayor es la concentración de la TGFβ, la expresión de *Irx1/2* es más amplia. La concentración menor no logra inducir la expresión de ninguno de los dos *Irxs* (Fig.13).

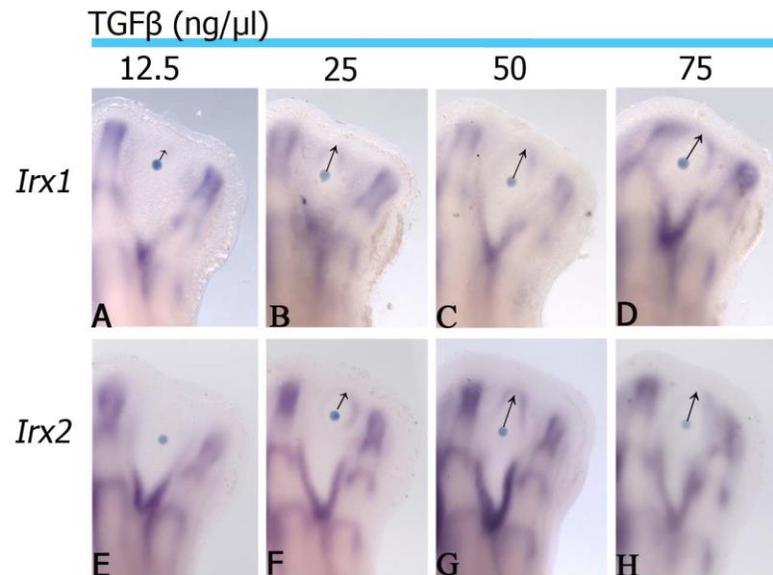


Figura 13. La expresión de *Irx1/2* se regula por TGFβ de una manera dependiente de la concentración-. La expresión inducida de *Irx1/2* en estadio 29HH en el interdígito después de 21 h de tratamiento con TGFβ. La dosis 12.5 ng/μl presenta una tenue inducción de *Irx1* (A y E). En la dosis de 25 ng/μl se observa alrededor del cartílago inducido (B, F). En las dosis de 50 ng/μl (C, G) y 75 ng/μl (D, H) se observa la expresión más abundante alrededor del cartílago. Las flechas negras muestran la distancia de la inducción de *Irx1/2*.

Adicionalmente, se evaluó la regulación de *Sox9* e *Irx1/2* en la punta del dedo en estadio 27HH. Se utilizó la concentración de 50ng/μl y se observó la regulación en los tiempos de 8 y 24 h. A las 8 h del tratamiento, TGFβ logró ampliar la expresión de *Sox9* en los dedos, incluso abarca parte del área interdital. La expresión de *Irx1/2* se observó dentro del dedo como una línea transversal en la falange y que en su región más distal es carente de la expresión de *Irx1/2*, esta área correlaciona con la expresión de *Sox9*, (Fig.14A-C). Después de 24 h de tratamiento, la expresión de *Irx1/2* rodeó el cartílago

positivo a *Sox9*, nuevamente marcando la zona del pericondrio (Fig.14D-F). Estos resultados concuerdan con lo observado en el dedo ectópico en donde también se observa alrededor del cartílago inducido positivo a *Sox9*. Lo que indica que *Irx1/2* no son necesarios en el inicio de la diferenciación condrogénica y que su expresión en el borde es dependiente de la cantidad de células inducidas a formar condrocitos

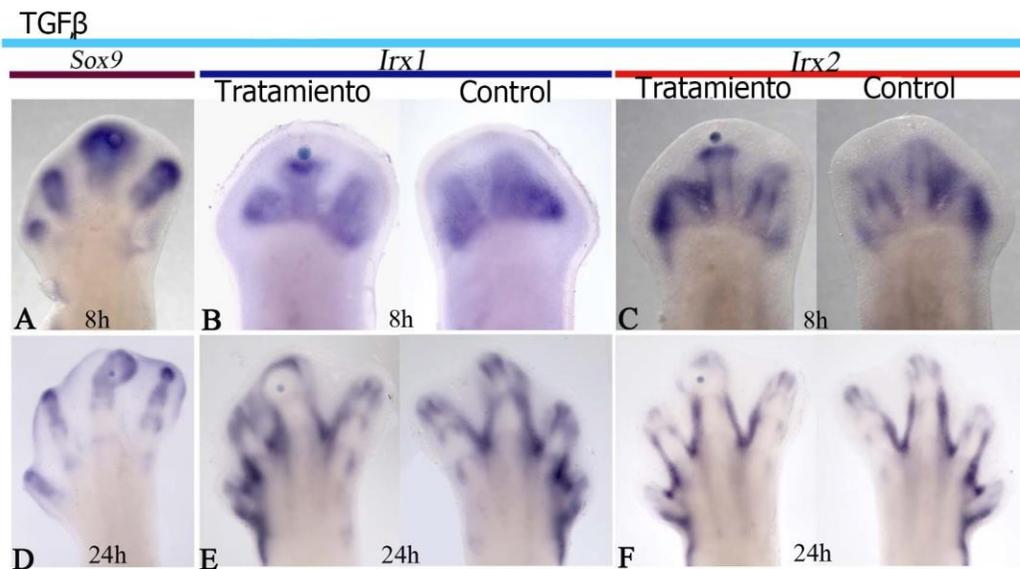


Figura 14. TGFβ regula la expresión de *Irx1/2* en la punta del dedo. El tratamiento de TGFβ en la punta del dedo en estadio 27HH, amplia la expresión de *Sox9* a las 8 h (A) y 24 h (D), mientras que, la expresión de *Irx1/2* se vio después de las 8 h. El efecto observado fue que TGFβ inhibe la expresión de *Irx1/2* sobre la perla, mientras que por debajo de ella, la expresión se notó como una línea transversal en la falange (B, C). Después de 24 h, la expresión de *Irx1/2* fue vista alrededor del cartílago inducido que tiene ahora una forma alargada, comparar con (D).

Irx2 es regulado por el señalamiento de FGF

A partir del patrón de expresión de *Irx1/2*, es claro que son ausentes en la región indiferenciada distal que es dependiente de la actividad del señalamiento de FGF. Decidimos evaluar si la ausencia de *Irxs* en la ZP, es debida a la inhibición producida por el

señalamiento de FGF. Debido a que en este trabajo se ha observado la regulación coordinada de *Irx1/2*, realizamos únicamente el análisis con *Irx2*. Se colocó el inhibidor SU5420 específico para los receptores de FGF en la ZP, en estadio 24 HH. Observamos que este tratamiento no fue capaz de inducir ectópicamente a *Irx2* en los tiempos de 2 h, 4 h, 8 h y que, más bien provocó la activación de la MCP, que se observó con Caspasa-3 activa desde las 2 h a bajos niveles y que fue extendiéndose desde la región cercana a la perla hacia la AER observándose una mayor intensidad de la marca a las 14 h (Fig.7A-H). Otro acercamiento consistió en colocar FGF8 o FGF10 en la región de expresión de *Irx2* en la extremidad posterior en estadio 24HH, lo cual provocó la inhibición de *Irx2* a las 4 h con FGF8 y a las 8 h con FGF10 (Fig.7I-J). Estos resultados muestran que la inhibición de FGF no es suficiente para inducir a *Irx* en la región distal.

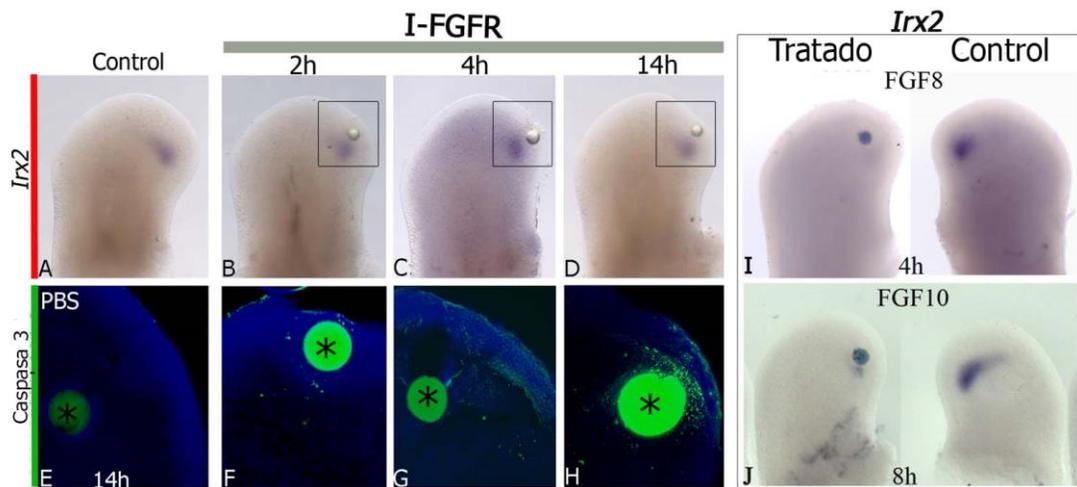


Figura 15. FGF regula negativamente la expresión de *Irx2*. Tratamiento en las extremidades de estadio 24HH con el inhibidor de FGFR (I-FGFR) SU5402 y la expresión de *Irx2* (A-D) e inmunolocalización de Caspasa 3 después de 2 h 4 h y 14 h (F-H). La inhibición del señalamiento de FGF no afecta la expresión de *Irx2* (B-D), sin embargo promueve la muerte celular desde las 2 h (F). La perla control embebida en PBS no promueve la muerte celular (E). La expresión de *Irx2* se disminuye después de 4 h de tratamiento con FGF8 (I) y 8 h con FGF10 (J).

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

De manera complementaria, durante mi proyecto de doctorado llevé a cabo tratamientos con TGF β , los cuales recaen dentro del contexto de la formación del dedo ectópico y que tienen el fin de describir mejor su formación. En particular, nosotros estamos interesados en la formación de las articulaciones y encontramos que, una buena manera de seguir como está se forma es durante la inducción del dedo ectópico.

Irx1/2 en la formación de las articulaciones

Como se mencionó en los antecedentes, se conoce muy poco acerca del origen e inducción de una articulación. Su ubicación entre los elementos esqueléticos ha hecho difícil, de conocer los requisitos a nivel molecular que se necesitan para su inducción. De esta manera, nosotros realizamos un seguimiento temporal de la expresión de genes que de alguna manera están involucrados en la formación de la articulación, en este contexto decidimos incluir a *Irx1/2* en nuestro estudio.

Encontramos que TGF β indujo a *Sox9* a los 30 minutos. *Gfd5*, conocido como el marcador de la articulación, fue inducido desde las 16 h. *Wnt9a* fue inducido a las 12h, *Fgf10* a las 14 h y posteriormente autotaxina a las 16h. Los genes *Irxs* como se describieron anteriormente se expresaron cercano a las 21 h. Mientras que *Gli3* y *Cd44* se indujeron a las 24 h. Estos resultados muestran que los cada uno de los genes inducido tienen una expresión diferencial durante el dedo en formación (Fig.16).

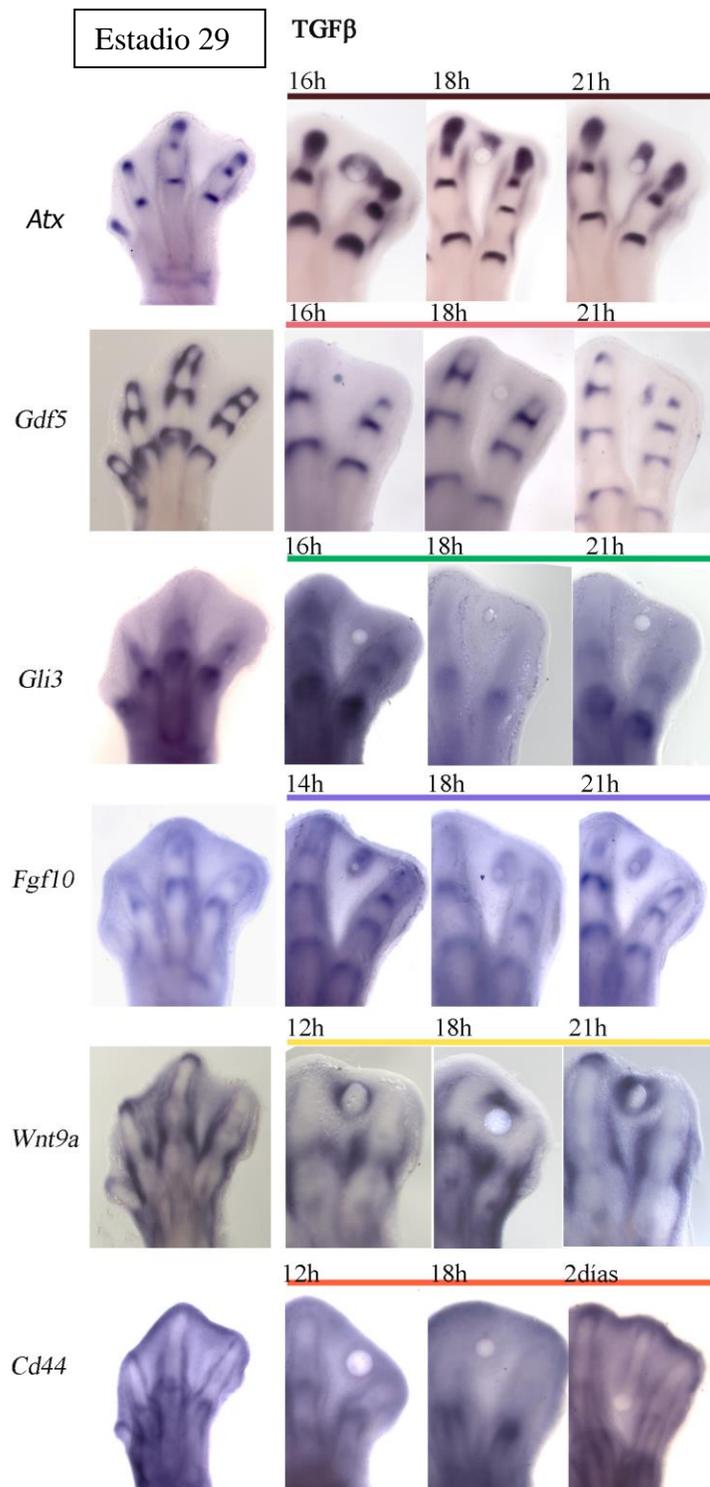


Figura 16. Organización temporal de la expresión de genes relacionados con la formación de las articulaciones. Se muestra la expresión normal en estadio 29HH y la expresión inducida durante la formación del dedo ectópico.

DISCUSION

La descripción de la expresión de *Irx1* en el autópodo de la extremidad posterior de pollo por McDonald (McDonald et al., 2010), que ubica a *Irx1* en las regiones de los dígitos, del pericondrio, en las articulaciones y por debajo de la zona indiferenciada. También, ése trabajo muestra una amplia expresión de *Irx2*. En este trabajo, nosotros, complementamos la expresión descrita de *Irx1/2*. Éstos se expresan coordinadamente, siempre compartiendo las áreas de expresión en los dígitos, articulaciones y pericondrio además, también son positivas las áreas de los interdígitos. Su expresión tanto en las áreas digitales e interdigitales inicia desde la región posterior hacia la región anterior del autópodo. Sin embargo, la expresión interdigital es temporalmente restringida, de posterior a anterior, para permanecer únicamente en las articulaciones y pericondrio. Estos resultados concuerdan con trabajos previos en los que se ha mostrado la expresión similar incluso idéntica por parte de miembros de la familia, por ejemplo en los tejidos y órganos de ratón (Becker et al., 2001; Bosse et al., 1997; Houweling et al., 2001; Zulch et al., 2001).

De acuerdo a trabajos previos, se sugiere que la función de *Irx1/2* puede estar asociada a sus sitios de expresión (Cavodeassi et al., 2001; Lecaudey et al., 2005). En este trabajo, evaluamos su regulación bajo el contexto de los procesos que llevan a la eliminación de las membranas interdigitales y la formación de los dedos. La progresiva desaparición de la expresión de *Irx1/2* en las áreas interdigitales a partir de los estadios 28-31HH correlaciona con la detección de muerte celular en los interdígitos. Por esto, decidimos evaluar su regulación por los factores proapoptóticos. El AR inductor de la muerte celular y su mediador BMP7. Mientras que, el AR provoca la inhibición de los

genes *Irx1/2*, BMP7 no genera efecto alguno sobre ellos, incluso se evaluó su regulación con el inhibidor de BMP, NOGGIN, sin embargo no produjo cambios. Esto indica que la inhibición de *Irx1/2* producida por el AR es independiente del señalamiento de BMP7. El AR y el BMP7 inducen muerte celular y activan a Caspasa-3 y esta inducción es posterior a la inhibición de *Irx1/2*. Estos resultados podrían explicar parte del fenotipo encontrado en las extremidades del mutante *Ft* que presenta muerte celular masiva con aumento de *Bmp4*, *Msx1/2* y *Dkk* componentes de la MCP. En otros modelos, como en *Drosophila* o *Xenopus* los genes *Irx* pueden restringir a *Msx1* o *Bmp4* (Glavic et al., 2001; Villa-Cuesta and Modolell, 2005). Esto sugiere que *Irx1/2* pueden tener una función protectora ante la MCP y que su regulación negativa sea necesaria para que la MCP ocurra. De acuerdo a los trabajos reportados, *Irx3*, *Irx5* e *Irx6* se expresan en las áreas interdigitales, pudiendo complementar su función protectora con *Irx1* e *Irx2* y estar directamente involucrados en la regulación de la muerte celular (Cheng et al., 2007; Houweling et al., 2001). En sistemas como en el pez Cebra la eliminación de los *Irx* da como resultado presencia de células muertas en la región rostral en el sistema nervioso central. De la misma manera, mediante el silenciamiento con morfolinós de *Irx1*, *Irx2*, *Irx3* e *Irx5* se incrementa la apoptosis en el mesénquima de pulmón en ratón *in vitro* (Feijoo et al., 2009; van Tuyl et al., 2006).

Además de su función en la MCP, el AR tiene actividad anticondrogénica y la capacidad de regular negativamente a *Sox9* (Hernández-Martínez et al., 2009; Rodríguez-León et al., 1999). Se observó en la punta del dedo, la inhibición conjunta de *Sox9* e *Irx1/2* a tiempos muy cortos con el tratamiento de AR y similar a lo observado en el interdígito, la inhibición de *Irx1/2* precede a la presencia de Caspasa-3 activa. Estos resultados, dieron pie para sugerir una regulación positiva de *Irx1/2* con la condrogénesis. TGF β es inductor de

Sox9 y de la condrogénesis, incluso en un área ectópica como lo es el interdígito. También TGF β , puede potenciar la condrogénesis en la punta del dedo. Con base en esto, observamos una regulación dual de TGF β sobre los genes *Irx* dependiente del estadio de desarrollo. En estadio 27HH, TGF β indujo la expresión de *Sox9* de manera exacerbada expandiéndose en el área interdigital, mientras los genes *Irx1/2* fueron inhibidos a los bordes del interdígito. En este mismo estadio, pero en la punta del dígito, el tratamiento de TGF β produjo que la expresión de *Irx1/2* sea observada como una línea por debajo de la perla y por arriba de la perla la expresión fuera inhibida. Esto puede ser reflejo de que en tiempos cortos la expresión de *Irx1/2* está siendo ajustada en la región distal. Al ser dependientes de la inducción de la diferenciación del cartílago promovido por TGF β , su expresión será localizada cuando el frente de diferenciación se haya establecido y de esta manera, su expresión se localizará en los bordes del cartílago. En estadio 29HH en el interdígito, TGF β indujo a *Sox9* a los 30 minutos junto a una cascada molecular condrogénica teniendo como resultado la formación de un dedo ectópico incluso con formación de una articulación. Dentro de este sistema, *Irx1/2* fueron inducidos después de las 12 h observándose alrededor de la región positiva a *Sox9*. En la punta del dedo, el tratamiento con TGF β produjo alargamiento del dedo y fue positivo a *Sox9*. Similar a lo encontrado en el dedo ectópico, la expresión de *Irx1/2* se encontró rodeando al cartílago inducido. Al ser temporalmente expresados, posterior a la expresión de *Sox9*, nos hace pensar que no son necesarios en la inducción de la condrogénesis. Puede considerarse que la expresión de *Irx1/2* en los límites de la condensación, pudiera tener un papel protector ante la PCD que se lleva a cabo en las áreas interdigitales. Además, los resultados mostraron que el rango de difusión de TGF β evaluado por su capacidad de promover condrogénesis puede demarcar la expresión de *Irx1/2*. Probablemente el frente de

diferenciación condrogénica sea antagonizado por un inhibidor condrogénico, lo que podría explicar la formación del pericondrio. Con base en esto, proponemos que la expresión de *Irx1/2* durante el desarrollo de los dígitos se encuentra delimitando las regiones del cartílago y no cartílago. Asimismo dentro del dedo ectópico observamos que la expresión de los genes *Irx1/2* coinciden con la expresión de genes estrechamente relacionados a la interzona. De esta manera, *Irx1/2* en la región proximal del dedo también podrían delimitar dos zonas, la región entre el cartílago y en este caso la interzona pudiendo también tener una función protectora en esta región, la cual sería necesaria para retrasar la muerte celular, que se lleva a cabo en el proceso de cavitación de la articulación (Ito and Kida, 2000).

En este trabajo también encontramos que *Irx1/2* son excluidos de la región indiferenciada distal mantenida por la AER, la cual tiene la función crucial en mantener las características de dicha población de células, esto mediante el señalamiento de FGF (Crossley et al., 1996; Fernandez-Teran and Ros, 2008; Lewandoski et al., 2000). Intentamos inducir la expresión de *Irx2* de manera ectópica hacia la región distal. Sin embargo, la inhibición de FGF produjo en las células desde las 2 h la activación de Caspasa-3 y el marcaje fue aumentando conforme el tiempo. Este efecto no permitió observar la regulación de *Irx2*. La aplicación de FGF8 o de FGF10 inhibe la expresión de *Irx2*. Es probable que FGF8 inhiba la expresión directamente y que FGF10 lo haga mediante la regulación indirecta de FGF8 (Liu et al., 2002).

La expresión de *Irx1/2* y su regulación coordinada tanto en las áreas digitales e interdigitales corrobora los trabajos en donde describen su co-regulación (de la Calle-Mustienes et al., 2005), estos trabajos indican que en el genoma existen potenciadores,

dentro del grupo que actúan de manera preferente sobre los dos primeros genes, lo que produce una regulación similar para ellos. El mecanismo crea regiones reguladoras dependientes del estadio y del tejido, pero que se han conservado a lo largo de los vertebrados.

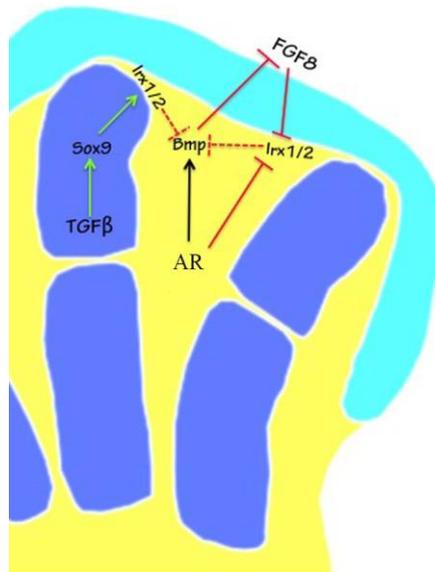


Figura 17. Modelo de interacciones que muestra la regulación de *Irx* por RA, TGFβ y FGF. Representación esquemática de la regulación de la expresión de *Irx1* e *Irx2* (*Irx1/2*) en las regiones digitales (azul) y regiones interdigitales (amarillo). La expresión de *Irx1/2* en los dígitos se localiza en el pericondrio. En el interdígito, las líneas punteadas sugieren una inhibición BMP4 y quizás de *Bmp7* y *Msx* (no mostrado) producida por la proteína IRX basados sobre los reportes en la literatura de (Glavic et al., 2001; Villa-Cuesta and Modolell, 2005). Mientras que el AR induce a las proteínas BMP e inhibe a los genes *Irxs*. La expresión de *Fgf10* promueve la expresión *Fgf8* el cual inhibe a *Irx1/2*.

CONCLUSIONES

Los siguientes resultados obtenidos durante el presente trabajo respaldan la hipótesis propuesta de este trabajo:

La expresión de *Irx1* e *Irx2* se presenta en los interdígitos. Esta información es adicional a su expresión digital, demostrada previamente por McDonald et al 2010. Su expresión los vincula a los procesos de condrogénesis y de muerte celular.

Se demostró, en el tercer interdígito que el AR involucrado en la MCP inhibe rápidamente a *Irx1* e *Irx2* (8h) mientras que la activación de Caspasa 3 lleva más tiempo (12h). Así, la inhibición de *Irx1* e *Irx2* precede al proceso de MCP.

Se demostró que el factor condrogénico TGF β regula a *Irx1* e *Irx2*. Estos genes responden de acuerdo al estadio en el que se encuentre de la extremidad. En 27HH, TGF β produce su inhibición (4h) debido al ajuste del área condrogénica. En estadio 29HH, en el que ya están definidos los cartílagos, la expresión de *Irx1* e *Irx2* se encuentran alrededor del dedo en formación (en tiempos cercanos a las 24h), incluso este mismo efecto es visto en el dedo ectópico. Esta regulación fue similar para ambos genes.

Adicionalmente, los tratamientos de TGF β a diferentes concentraciones en el interdígito por 21h, indujo la expresión de *Irx1* e *Irx2* y nos dio evidencias del modo en que estos son regulados, a mayor concentración de TGF β mayor área condrogénica y en sus límites se observa la expresión de *Irx1* e *Irx2*.

Finalmente, siempre observamos una similar regulación de *Irx1* e *Irx2* ante los factores apoptóticos y condrogénicos

REFERENCIAS

- Abarca-Buis, R. F., Bustamante, M., Cuervo, R., Aguilar-Fernandez-de-Lara, D., Chimal-Monroy, J., 2011. Smad8 is expressed in the anterior necrotic zone: evidence for a role of bone morphogenetic proteins/SMAD signaling in the activation of a molecular cascade that culminates in cell death. *Dev Growth Differ.* 53, 780-92.
- Ahuja, H. S., James, W., Zakeri, Z., 1997. Rescue of the limb deformity in hammetoe mutant mice by retinoic acid-induced cell death. *Dev Dyn.* 208, 466-81.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., de Crombrughe, B., 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, 2813-28.
- Alarcon, P., Rodriguez-Seguel, E., Fernandez-Gonzalez, A., Rubio, R., Gomez-Skarmeta, J. L., 2008. A dual requirement for Iroquois genes during *Xenopus* kidney development. *Development.* 135, 3197-207.
- Altabef, M., Tickle, C., 2002. Initiation of dorso-ventral axis during chick limb development. *Mech Dev.* 116, 19-27.
- Aszodi, A., Hunziker, E. B., Brakebusch, C., Fassler, R., 2003. Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* 17, 2465-79.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V., Tabin, C. J., 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2, e216.
- Becker, M. B., Zulch, A., Bosse, A., Gruss, P., 2001. *Irx1* and *Irx2* expression in early lung development. *Mech Dev.* 106, 155-8.
- Bellefroid, E. J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J. B., Papalopulu, N., 1998. *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois genes and functions in neural specification. *EMBO J.* 17, 191-203.
- Bosse, A., Zulch, A., Becker, M. B., Torres, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Modolell, J., Gruss, P., 1997. Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech Dev.* 69, 169-81.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.* 280, 1455-7.
- Burglin, T. R., 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 25, 4173-80.
- Capdevila, J., Izpisua Belmonte, J. C., Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, Vol. 17, 2001, pp. 87-132.
- Cavodeassi, F., Modolell, J., Gomez-Skarmeta, J. L., 2001. The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development.* 128, 2847-55.
- Cillo, C., Cantile, M., Faiella, A., Boncinelli, E., 2001. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 188, 161-9.

- Coelho, C. N., Upholt, W. B., Kosher, R. A., 1993. Ectoderm from various regions of the developing chick limb bud differentially regulates the expression of the chicken homeobox-containing genes GHox-7 and GHox-8 by limb mesenchymal cells. *Dev Biol.* 156, 303-6.
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., Martin, G. R., 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell.* 84, 127-36.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., Golstein, P., 1999. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol.* 9, 967-70.
- Cheng, C. W., Yan, C. H., Choy, S. W., Hui, M. N., Hui, C. C., Cheng, S. H., 2007. Zebrafish homologue *irx1a* is required for the differentiation of serotonergic neurons. *Dev Dyn.* 236, 2661-7.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., Beachy, P. A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 383, 407-13.
- Chimal-Monroy, J., Abarca-Buis, R. F., Cuervo, R., Diaz-Hernandez, M., Bustamante, M., Rios-Flores, J. A., Romero-Suarez, S., Farrera-Hernandez, A., 2011. Molecular control of cell differentiation and programmed cell death during digit development. *IUBMB Life.* 63, 899-906.
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R., Hurle, J. M., 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 257, 292-301.
- Chimal-Monroy, J. G.-C., D. Abarca-Buis René Fernando and Ríos-Flores Alberto, J, 2005. Coordination of joint formation and cartilage differentiation in the appendicular skeleton. *Trends in Developmental Biology.* 1, 47-53.
- Dambly-Chaudiere, C., Leyns, L., 1992. The determination of sense organs in *Drosophila*: a search for interacting genes. *Int J Dev Biol.* 36, 85-91.
- Daniels, K., Solursh, M., 1991. Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J Cell Sci.* 100 (Pt 2), 249-54.
- de la Calle-Mustienes, E., Feijoo, C. G., Manzanares, M., Tena, J. J., Rodriguez-Seguel, E., Letizia, A., Allende, M. L., Gomez-Skarmeta, J. L., 2005. A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts. *Genome Res.* 15, 1061-72.
- Delise, A. M., Tuan, R. S., 2002. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn.* 225, 195-204.
- Dessau, W., von der Mark, H., von der Mark, K., Fischer, S., 1980. Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol.* 57, 51-60.
- Dowthwaite, G. P., Edwards, J. C., Pitsillides, A. A., 1998. An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development. *J Histochem Cytochem.* 46, 641-51.
- Duboule, D., 1999. No milk today (my Hox have gone away). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 322-3.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., Karsenty, G., 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89, 747-54.

- Duester, G., Mic, F. A., Molotkov, A., 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact.* 143-144, 201-10.
- Dupe, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J., Chambon, P., Mark, M., 1999. Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol.* 208, 30-43.
- Duprez, D. M., Coltey, M., Amthor, H., Brickell, P. M., Tickle, C., 1996. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol.* 174, 448-52.
- Enomoto, H., Shiojiri, S., Hoshi, K., Furuichi, T., Fukuyama, R., Yoshida, C. A., Kanatani, N., Nakamura, R., Mizuno, A., Zanma, A., Yano, K., Yasuda, H., Higashio, K., Takada, K., Komori, T., 2003. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. *J Biol Chem.* 278, 23971-7.
- Fallon, J. F., Cameron, J., 1977. Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J Embryol Exp Morphol.* 40, 285-9.
- Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B., Simandl, B. K., 1994. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science.* 264, 104-7.
- Feijoo, C. G., Saldias, M. P., De la Paz, J. F., Gomez-Skarmeta, J. L., Allende, M. L., 2009. Formation of posterior cranial placode derivatives requires the Iroquois transcription factor *irx4a*. *Mol Cell Neurosci.* 40, 328-37.
- Fell, H. B., Robison, R., 1934. The development of the calcifying mechanism in avian cartilage and osteoid tissue. *Biochem J.* 28, 2243-53.
- Ferguson, C. M., Miclau, T., Hu, D., Alpern, E., Helms, J. A., 1998. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci.* 857, 33-42.
- Fernandez-Teran, M., Ros, M. A., 2008. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol.* 52, 857-71.
- Fernandez-Teran, M. A., Hinchliffe, J. R., Ros, M. A., 2006. Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev Dyn.* 235, 2521-37.
- Ganan, Y., Macias, D., Basco, R. D., Merino, R., Hurle, J. M., 1998. Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of *msx* gene expression in the developing autopod. *Dev Biol.* 196, 33-41.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A., Hurle, J. M., 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, 2349-57.
- Garcia-Martinez, V., Macias, D., Ganan, Y., Garcia-Lobo, J. M., Francia, M. V., Fernandez-Teran, M. A., Hurle, J. M., 1993. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci.* 106 (Pt 1), 201-8.
- Garcia-Diego-Cazares, D., Rosales, C., Katoh, M., Chimal-Monroy, J., 2004. Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development.* 131, 4735-42.

- Garriock, R. J., Vokes, S. A., Small, E. M., Larson, R., Krieg, P. A., 2001. Developmental expression of the *Xenopus* Iroquois-family homeobox genes, *Irx4* and *Irx5*. *Dev Genes Evol.* 211, 257-60.
- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Prols, F., Patel, K., Scaal, M., Huang, R., Christ, B., 2005. Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis. *Dev Biol.* 288, 221-33.
- Gehring, W. J., Hiromi, Y., 1986. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet.* 20, 147-73.
- Ghyselinck, N. B., Dupe, V., Dierich, A., Messaddeq, N., Garnier, J. M., Rochette-Egly, C., Chambon, P., Mark, M., 1997. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol.* 41, 425-47.
- Glavic, A., Gomez-Skarmeta, J. L., Mayor, R., 2001. Xiro-1 controls mesoderm patterning by repressing *bmp-4* expression in the Spemann organizer. *Dev Dyn.* 222, 368-76.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J., Mayor, R., 1998. Xiro, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* 17, 181-90.
- Goriely, A., Diez del Corral, R., Storey, K. G., 1999. *c-Irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech Dev.* 87, 203-6.
- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B., Fassler, R., 2003. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep.* 4, 432-8.
- Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L., Hinck, A. P., 2008. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell.* 29, 157-68.
- Grotewold, L., Ruther, U., 2002. The Fused toes (Ft) mouse mutation causes anteroposterior and dorsoventral polydactyly. *Dev Biol.* 251, 129-41.
- Guo, X., Day, T. F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L., Yang, Y., 2004. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18, 2404-17.
- Hall, B. K., 2000. A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. *Cells Tissues Organs.* 166, 6-14.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn.* 195, 231-72.
- Hanada, K., Solchaga, L. A., Caplan, A. I., Hering, T. M., Goldberg, V. M., Yoo, J. U., Johnstone, B., 2001. BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 81, 284-94.
- Hartmann, C., Tabin, C. J., 2001. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell.* 104, 341-51.
- Heffer, A., Pick, L., 2013. Conservation and variation in hox genes: how insect models pioneered the evo-devo field. *Annu Rev Entomol.* 58, 161-79.
- Heldin, C. H., Landstrom, M., Moustakas, A., 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* 21, 166-76.
- Hernandez-Martinez, R., Castro-Obregon, S., Covarrubias, L., 2009. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development.* 136, 3669-78.

- Hernandez-Martinez, R., Covarrubias, L., 2011. Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Dev Growth Differ.* 53, 245-58.
- Heymer, J., Ruther, U., 1999. Syndactyly of Ft/+ mice correlates with an imbalance in bmp4 and fgf8 expression. *Mech Dev.* 88, 173-81.
- Hong, S. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L., 2004. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 25, 259-64.
- Houweling, A. C., Dildrop, R., Peters, T., Mummenhoff, J., Moorman, A. F., Ruther, U., Christoffels, V. M., 2001. Gene and cluster-specific expression of the Iroquois family members during mouse development. *Mech Dev.* 107, 169-74.
- Hurle, J., Hinchcliffe, J. R., 1978. Cell death in the posterior necrotic zone (PNZ) of the chick wing-bud: a stereoscan and ultrastructural survey of autolysis and cell fragmentation. *J Embryol Exp Morphol.* 43, 123-36.
- Hurle, J. M., Ganan, Y., Macias, D., 1989. Experimental analysis of the in vivo chondrogenic potential of the interdigital mesenchyme of the chick leg bud subjected to local ectodermal removal. *Dev Biol.* 132, 368-74.
- Hurle, J. M., Ros, M. A., Climent, V., Garcia-Martinez, V., 1996. Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microsc Res Tech.* 34, 236-46.
- Idres, N., Marill, J., Flexor, M. A., Chabot, G. G., 2002. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J Biol Chem.* 277, 31491-8.
- Ito, M. M., Kida, M. Y., 2000. Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat.* 197 Pt 4, 659-79.
- Jacobsen, M. D., Weil, M., Raff, M. C., 1996. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol.* 133, 1041-51.
- Jacobson, M. D., 1997. Programmed cell death: a missing link is found. *Trends Cell Biol.* 7, 467-9.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C., Izpisua Belmonte, J. C., 2001. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell.* 104, 891-900.
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Pena, J., Johnson, R. L., Izpisua Belmonte, J. C., Tabin, C. J., 1998. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science.* 280, 1274-7.
- Koyama, E., Shibukawa, Y., Nagayama, M., Sugito, H., Young, B., Yuasa, T., Okabe, T., Ochiai, T., Kamiya, N., Rountree, R. B., Kingsley, D. M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Pacifici, M., 2008. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol.* 316, 62-73.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., Flavell, R. A., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* 94, 325-37.
- Kulyk, W. M., Upholt, W. B., Kosher, R. A., 1989. Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development.* 106, 449-55.
- Lebel, M., Agarwal, P., Cheng, C. W., Kabir, M. G., Chan, T. Y., Thanabalasingham, V., Zhang, X., Cohen, D. R., Husain, M., Cheng, S. H., Bruneau, B. G., Hui, C. C.,

2003. The Iroquois homeobox gene *Irx2* is not essential for normal development of the heart and midbrain-hindbrain boundary in mice. *Mol Cell Biol.* 23, 8216-25.
- Lecaudey, V., Anselme, I., Dildrop, R., Ruther, U., Schneider-Maunoury, S., 2005. Expression of the zebrafish Iroquois genes during early nervous system formation and patterning. *J Comp Neurol.* 492, 289-302.
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., de Crombrughe, B., 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol.* 17, 2336-46.
- Lefebvre, V., Li, P., de Crombrughe, B., 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 17, 5718-33.
- Letizia, A., Barrio, R., Campuzano, S., 2007. Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the iroquois genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development.* 134, 1337-46.
- Lewandoski, M., Sun, X., Martin, G. R., 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet.* 26, 460-3.
- Leyns, L., Gomez-Skarmeta, J. L., Dambly-Chaudiere, C., 1996. iroquois: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech Dev.* 59, 63-72.
- Liu, Y., Liu, C., Yamada, Y., Fan, C. M., 2002. Growth arrest specific gene 1 acts as a region-specific mediator of the Fgf10/Fgf8 regulatory loop in the limb. *Development.* 129, 5289-300.
- MacCabe, J. A., Errick, J., Saunders, J. W., Jr., 1974. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol.* 39, 69-82.
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A., Hurle, J. M., 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124, 1109-17.
- Mark, M., Ghyselinck, N. B., Chambon, P., 2009. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal.* 7, e002.
- Massague, J., Chen, Y. G., 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14, 627-44.
- Matsumoto, K., Nishihara, S., Kamimura, M., Shiraishi, T., Otoguro, T., Uehara, M., Maeda, Y., Ogura, K., Lumsden, A., Ogura, T., 2004. The prepattern transcription factor *Irx2*, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nat Neurosci.* 7, 605-12.
- McDonald, L. A., Gerrelli, D., Fok, Y., Hurst, L. D., Tickle, C., 2010. Comparison of Iroquois gene expression in limbs/fins of vertebrate embryos. *J Anat.* 216, 683-91.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T., Hurle, J. M., 1998. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol.* 200, 35-45.
- Milaire, J., 1992. A new interpretation of the necrotic changes occurring in the developing limb bud paddle of mouse embryos based upon recent observations in four different phenotypes. *Int J Dev Biol.* 36, 169-78.
- Molotkov, A., Duyster, G., 2003. Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase *Raldh1* (*Aldh1a1*) functions downstream of alcohol dehydrogenase *Adh1* in metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem.* 278, 36085-90.

- Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A., Hurle, J. M., 2001. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development*. 128, 2075-84.
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Ganan, Y., Macias, D., Hurle, J. M., 2008. Activin/TGFbeta and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Dev Biol*. 321, 343-56.
- Moon, A. M., Boulet, A. M., Capecchi, M. R., 2000. Normal limb development in conditional mutants of *Fgf4*. *Development*. 127, 989-96.
- Moustakas, A., Heldin, C. H., 2009. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development*. 136, 3699-714.
- Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., Heldin, C. H., 2002. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett*. 82, 85-91.
- Mueller, T. D., Nickel, J., 2012. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett*. 586, 1846-59.
- Nakanishi, K., Maruyama, M., Shibata, T., Morishima, N., 2001. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem*. 276, 41237-44.
- Ng, K. W., Romas, E., Donnan, L., Findlay, D. M., 1997. Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 11, 1-22.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., Martin, G. R., 1993. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*. 75, 579-87.
- Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y., Lewandoski, M., 2007. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development*. 134, 2359-68.
- Parr, B. A., McMahon, A. P., 1995. Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374, 350-3.
- Pearse, R. V., 2nd, Scherz, P. J., Campbell, J. K., Tabin, C. J., 2007. A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol*. 310, 388-400.
- Pennimpede, T., Cameron, D. A., MacLean, G. A., Li, H., Abu-Abed, S., Petkovich, M., 2010. The role of CYP26 enzymes in defining appropriate retinoic acid exposure during embryogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 88, 883-94.
- Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K., Ruther, U., 2000. Organization of mouse Iroquois homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res*. 10, 1453-62.
- Retting, K. N., Song, B., Yoon, B. S., Lyons, K. M., 2009. BMP canonical Smad signaling through *Smad1* and *Smad5* is required for endochondral bone formation. *Development*. 136, 1093-104.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 75, 1401-16.
- Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Santesteban, E., Hurle, J. M., 1999. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat Cell Biol*. 1, 125-6.
- Rodriguez-Seguel, E., Alarcon, P., Gomez-Skarmeta, J. L., 2009. The *Xenopus Irx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Fezf* and *Arx*. *Dev Biol*. 329, 258-68.

- Ros, M. A., Piedra, M. E., Fallon, J. F., Hurle, J. M., 1997. Morphogenetic potential of the chick leg interdigital mesoderm when diverted from the cell death program. *Dev Dyn.* 208, 406-19.
- Staines, K.A. Macrae; V.E Farqhanson, C. 2012. Cartilage development and degeneration: a wnt wnt situation. *Cell. Biochem. Funct.* 30, 633-642.
- 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, 363-403.
- Saunders, J. W., Jr., 1996. Operations on limb buds of avian embryos. *Methods Cell Biol.* 51, 125-45.
- Saunders, J. W., Jr., 1998. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. 1948. *J Exp Zool.* 282, 628-68.
- Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., Noda, M., 2000. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem.* 275, 10738-44.
- Shakibaei, M., 1998. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res.* 240, 95-106.
- Shimizu, H., Yokoyama, S., Asahara, H., 2007. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ.* 49, 449-54.
- Shinomura, T., Jensen, K. L., Yamagata, M., Kimata, K., Solursh, M., 1990. The distribution of mesenchyme proteoglycan (PG-M) during wing bud outgrowth. *Anat Embryol (Berl).* 181, 227-33.
- Shum, L., Nuckolls, G., 2002. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res.* 4, 94-106.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., Lefebvre, V., 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell.* 1, 277-90.
- Sodek, J., Li, J. J., Kim, R. H., Ogata, Y., Yamauchi, M., 1996. Characterization of the bone sialoprotein (BSP) gene promoter. *Connect Tissue Res.* 35, 23-31.
- Spater, D., Hill, T. P., Gruber, M., Hartmann, C., 2006a. Role of canonical Wnt-signalling in joint formation. *Eur Cell Mater.* 12, 71-80.
- Spater, D., Hill, T. P., O'Sullivan R, J., Gruber, M., Conner, D. A., Hartmann, C., 2006b. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Development.* 133, 3039-49.
- Spicer, A. P., Tien, J. Y., 2004. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 72, 89-108.
- Storm, E. E., Huynh, T. V., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M., Lee, S. J., 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature.* 368, 639-43.
- Summerbell, D., Lewis, J. H., 1975. Time, place and positional value in the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol.* 33, 621-43.
- Sun, X., Mariani, F. V., Martin, G. R., 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature.* 418, 501-8.

- ten Berge, D., Brugmann, S. A., Helms, J. A., Nusse, R., 2008. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*. 135, 3247-57.
- ten Dijke, P., Korchynskiy, O., Valdimarsdottir, G., Goumans, M. J., 2003. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 211, 105-13.
- Tickle, C., 2003. Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell*. 4, 449-58.
- Tickle, C., Summerbell, D., Wolpert, L., 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*. 254, 199-202.
- van Tuyl, M., Liu, J., Groenman, F., Ridsdale, R., Han, R. N., Venkatesh, V., Tibboel, D., Post, M., 2006. Iroquois genes influence proximo-distal morphogenesis during rat lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290, L777-L789.
- Villa-Cuesta, E., Modolell, J., 2005. Mutual repression between msh and Iro-C is an essential component of the boundary between body wall and wing in *Drosophila*. *Development*. 132, 4087-96.
- von der Mark, K., von der Mark, H., Gay, S., 1976. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. II. Localization of type I and type II collagen during long bone development. *Dev Biol*. 53, 153-70.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., Werb, Z., 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*. 93, 411-22.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schempp, W., Scherer, G., 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 79, 1111-20.
- Wanek, N., Muneoka, K., Bryant, S. V., 1989. Evidence for regulation following amputation and tissue grafting in the developing mouse limb. *J Exp Zool*. 249, 55-61.
- Wolpert, L., 2002. The progress zone model for specifying positional information. *Int J Dev Biol*. 46, 869-70.
- Wolpert, L., Lewis, J., Summerbell, D., 1975. Morphogenesis of the vertebrate limb. *Ciba Found Symp*. 0, 95-130.
- Xu, J., Liu, Z., Ornitz, D. M., 2000. Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development*. 127, 1833-43.
- Yang, J., Wu, J., Tan, C., Klein, P. S., 2003. PP2A:B56epsilon is required for Wnt/beta-catenin signaling during embryonic development. *Development*. 130, 5569-78.
- Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R., Lyons, K. M., 2005. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 5062-7.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B., 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn*. 209, 377-86.
- Zhao, X., Brade, T., Cunningham, T. J., Duester, G., 2010. Retinoic acid controls expression of tissue remodeling genes Hmgn1 and Fgf18 at the digit-interdigit junction. *Dev Dyn*. 239, 665-71.

- Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., Lee, B., 2003. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol.* 162, 833-42.
- Zou, H., Niswander, L., 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science.* 272, 738-41.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J., Niswander, L., 1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11, 2191-203.
- Zulch, A., Becker, M. B., Gruss, P., 2001. Expression pattern of *Irx1* and *Irx2* during mouse digit development. *Mech Dev.* 106, 159-62.
- Zuzarte-Luis, V., Berciano, M. T., Lafarga, M., Hurle, J. M., 2006. Caspase redundancy and release of mitochondrial apoptotic factors characterize interdigital apoptosis. *Apoptosis.* 11, 701-15.
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Rodriguez-Rey, J. C., Hurle, J. M., 2004. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol.* 272, 39-52.