



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

La inhibición de Wnt β -catenina es suficiente y necesaria para la regulación de
Scleraxis durante la formación de los tendones.

T E S I S

QUE PARA OBTENER POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

VALENTINA GARCÍA LEE

DIRECTOR DE TESIS

JESÚS CHIMAL MONROY



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Marcadores moleculares de los tendones	6
Vías de señalización implicadas en el desarrollo de los tendones	9
<i>Vía de señalización TGFβ/SMAD</i>	10
<i>WNT/β-catenina en la tenogénesis</i>	17
<i>Interacción de las vías de señalización WNT y TGFβ</i>	21
MARCO TEÓRICO	24
Contexto embrionario del desarrollo de los tendones de las extremidades	25
Diferenciación mesenquimal hacia el linaje tenogénico	28
Papel del ectodermo en la inducción y la diferenciación de los tendones	32
Planteamiento del Problema	36
Hipótesis	36
Objetivo	36
Materiales y métodos	37
Animales	37
Proteínas y fármacos	37
Experimentación <i>in ovo</i>	38
Ribosondas de cDNA	39
Hibridación <i>in situ</i>	40
Cortes en vibratomo	40
Captura de imágenes	40
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	58
REFERENCIAS	60

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi tutor, quien me guio durante la realización de este trabajo. El gran aprendizaje personal y académico que me llevo después de todos estos años, gracias por la oportunidad de corregir errores y empezar de nuevo, de perseverar y acompañarme para concluir este complicado proceso.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) le agradezco la beca recibida durante el doctorado en apoyo al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud. El presente proyecto se realizó gracias a los financiamientos otorgados por CONACyT (53484 y 168642), Fronteras de la Ciencia-Conacyt (1887), DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México (IN213314 and IN211117).

A la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, quien desde el primer día que decidí entrar al posgrado me ha brindado su apoyo, gracias por abrirme la puerta para escribir historia.

A mi comité tutorial, la Dra. Martha Robles Flores y la Dra. Marina Macías Silva, agradezco sus múltiples sugerencias y consideraciones a lo largo de mi tiempo en el posgrado, sin duda fueron de gran ayuda para mejorar como estudiante.

A la Dra. Martha Elena Díaz Hernández, por su invaluable colaboración para llevar a término este trabajo, mi agradecimiento infinito. Cada consejo, recordatorio, enseñanza y cada regaño valieron la pena, gracias.

A mi jurado de examen por sus comentarios, en especial a la Dra. Diana Escalante Alcalde por el rigor y la dedicación para revisar mi trabajo.

RESUMEN

La formación de los tendones en las extremidades en desarrollo es un paradigma para entender la diferenciación celular. El linaje tenogénico se origina a partir de las células mesenquimales localizadas entre el ectodermo y los elementos esqueléticos en formación. Durante el desarrollo del sistema musculoesquelético, las vías de señalización WNT/ β -catenina y TGF β /SMAD juegan papeles importantes en la morfogénesis de los tejidos a través de procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. La señalización WNT/ β -catenina inhibe la diferenciación del cartílago y, está involucrada en la especificación del tejido conjuntivo. La señalización TGF β /SMAD es necesaria para el mantenimiento y reclutamiento de células del linaje tenogénico. Sin embargo, es poco claro cómo se integran las señales que regulan la diferenciación de los tenocitos, debido a que *Scx*, el marcador más temprano de los tendones se expresa aún en ausencia de TGF β . Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar en el modelo de desarrollo de extremidad *in ovo* la relación entre las vías de señalización WNT/ β -catenina y TGF β sobre la inducción de los tendones utilizando como marcador el factor de transcripción *Scx*. Se realizaron tratamientos con las proteínas WNT3A, DKK1 y TGF β 1, así como los inhibidores de la vía TGF β , SB431542 y SIS3 en una zona presuntiva tenogénica del autópodo del pollo. Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos para analizar los cambios en la expresión de *Scx*, *Axina2* y *N-Myc* en todo el espesor del mesénquima. Los resultados mostraron que WNT3A inhibe la expresión de *Scx*, mientras que DKK, antagonista de la vía, induce a *Scx* aún en presencia de los inhibidores de TGF β . El análisis en los cortes histológicos de las hibridaciones *in situ* evidenció que TGF β 1 regula diferencialmente los genes blanco de la vía canónica de WNT. Adicionalmente, el análisis de los cortes de las hibridaciones *in situ* de *Scx* evidenciaron que, mientras que con los tratamientos de WNT3A y TGF β 1 se observa un efecto restringido al mesénquima que se encuentra en contacto con el ectodermo, el tratamiento con DKK1 pudo inducir *Scx* en todo el espesor del mesénquima. En conclusión, para dar inicio al programa de diferenciación tenogénica, la inhibición de la actividad de WNT/ β -catenina es necesaria y suficiente; adicionalmente a la inducción necesaria mediada por TGF β /SMAD para mantener el estado de diferenciación de los tenocitos.

ABSTRACT

Tendon formation in developing limbs is a paradigm for the understanding of cell differentiation. Tenogenic lineage arises from the mesenchymal cells located between the ectoderm and cartilage. During musculoskeletal development, WNT/ β -catenin and TGF β /SMAD signaling pathways direct tissue shaping by the processes of proliferation differentiation and cell death. It is known that WNT/ β -catenin signaling inhibits cell differentiation; at the same time, it is a requirement for the specification of connective tissue. On the other hand, TGF β /SMAD is necessary for the maintenance and recruitment of the tenogenic lineage cells. However, it is unclear if both signals are integrated to induce tenocyte differentiation because *Scx*, the earliest marker of tendons, is still expressed in the null mutants of TGF β . Therefore, the relationship of the WNT/ β -catenin and TGF β signaling pathways on the induction of the *Scx* transcription factor was studied *in ovo* model of limb development. Thus, treatments with the proteins WNT3A, DKK1, and TGF β 1 were used, also the TGF β inhibitors SB431542 and SIS3 small molecule compounds in a presumptive tenogenic zone of the chicken autopod. Changes in *Scx* expression are evaluated by whole mount *in situ* hybridization. Furthermore, sections were used to analyze changes in the expression of *Scx*, *Axin2*, and *N-Myc* throughout the thickness of the mesenchyme. Results showed WNT3A inhibits the expression of *Scx*, while DKK1, an antagonist of the pathway, induces *Scx* even in the presence of TGF β inhibitors. The analysis of the sections of hybridizations *in situ* shown that TGF β 1 differentially regulates the target genes of the WNT canonical pathway. Furthermore, the analysis of the sections of the *in situ* hybridizations of *Scx* showed that treatments of WNT3A and TGF β 1 had a restricted effect on the mesenchyme that is in contact with the ectoderm. In contrast, DKK1 treatments could induce *Scx* in the entire thickness of the mesenchyme. In conclusion, to initiate the tenogenic differentiation program, the inhibition of WNT/ β -catenin activity is sufficient and necessary, while TGF β /SMAD is necessary but not sufficient to maintain the expression of *Scx*.

INTRODUCCIÓN

Los tendones son tejidos conjuntivos que transmiten la fuerza que generan los músculos hacia los huesos. A lo largo de su extensión y dependiendo del tejido del que estén cerca, los tendones se encuentran sometidos grandes cargas de tensión, compresión y corte. Estos tejidos soportan las cargas debido a que se componen predominantemente de matriz extracelular (MEC) (Benjamin and Ralphs, 2000).

Los tendones son estructuras planas que conectan los músculos con los huesos. Anatómicamente, las uniones miotendinosas pueden consistir en fibras de colágena de los tendones que se insertan entre los vientres musculares, o como láminas de fibras que se insertan en las superficies o intercaladas con las fibras musculares formando estructuras ovales, mientras más cerca están del hueso, se vuelven más aplanados. Esto sugiere que existe una asociación directa entre el patrón de transmisión de fuerzas y la composición anatómica y molecular del tejido conjuntivo (Kalson *et al.*, 2015; T. *et al.*, 2003). En etapas postnatales, el módulo elástico de los tendones en el pollo adulto incrementa 40,000 veces respecto a los tendones fetales (Schiele *et al.*, 2013).

En general, los tendones no están calcificados, sin embargo, pueden contener nódulos óseos especialmente en los huesos de las extremidades inferiores y en las capas profundas de las inserciones de los tendones fibrocartilagosos, especialmente en humano y pollo (Benjamin *et al.*, 2006; Dennis and McKinney, 1990) (**Fig. 1**). La mineralización de los tendones se previene por la expresión del factor de transcripción Msx1/2 (Yoshizawa *et al.*, 2004). Recientemente se ha generado mucha información acerca de la relación entre el cartílago y el hueso, y en menor grado se ha obtenido información relevante para comprender la

reparación de los tendones (Felsenthal *et al.*, 2018; Sugimoto *et al.*, 2013; Zhang and Chang, 2003).

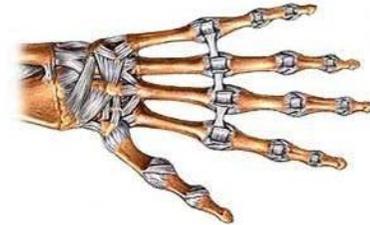
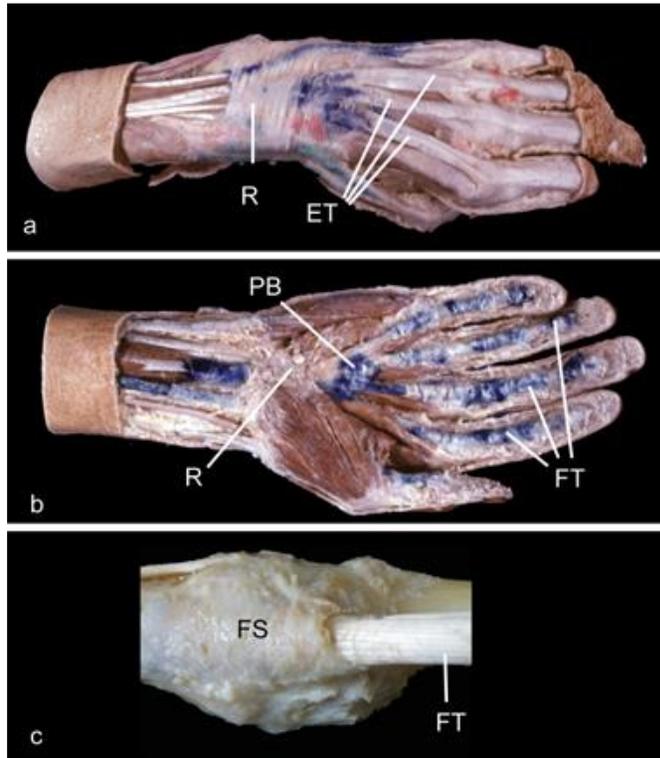


Figura 1. Vainas sinoviales asociadas a los tendones de la muñeca y la mano. Como se demuestra en los especímenes inyectados con colorante azul. Nótese la presencia de las vainas rodeando los tendones flexores digitales (FT), y su ausencia en relación con los tendones extensores (ET). En ambos lados, extensor (a) y flexor (b), las vainas sinoviales se extienden más allá de los límites de la retináculo de la muñeca (R) para permitir la excusión longitudinal de los tendones. La bursa palmar es evidente en (b). (c) Los tendones flexores digitales (FT) entran al túnel creado por el flexor fibroso Tomado de: *Where tendons and ligaments meet bone: Attachment sites*

(‘entheses’) in relation to exercise and/or mechanical load. (Benjamin *et al.*, 2008). (d) Representación esquemática de los ligamentos de la mano. Tomado de: *A.D.A.M. Student Atlas of Anatomy*. (Olson and Pawlina, 2008).

Estructuralmente, el componente principal de la MEC de los tendones es la Colágena tipo I que presenta una organización de fibras orientadas paralelas al eje de los tendones. En menor abundancia, se encuentran las colágenas fibrilares III y V, así como las colágenas no fibrilares XII y XIV, también conocidas como FACIT (por sus siglas en inglés fibril-associated collagens with interrupted triple hélices) son importantes para la formación de fibrillas, crecimiento y el mantenimiento de la integridad de los tendones. El ensamblaje de los componentes de la matriz depende de fibras intersticiales que facilitan la formación de puentes entre las fibrillas y otros componentes de la MEC. Entre los componentes de la matriz

interfibrilar se encuentran los proteoglicanos como Biglicano, Decorina y Lumicano (Edom-Vovard and Duprez, 2004). La proteína Tendomulina (TNMD), es un proteoglicano transmembranal que se expresa en los tejidos conjuntivos densos como los tendones, ligamentos, epimisio del músculo esquelético, córnea y esclera (Brandau *et al.*, 2001; Shukunami *et al.*, 2001; Shukunami *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que la TNMD, regula la proliferación celular y la organización de las fibras de los tendones (Docheva *et al.*, 2005). Estudios más recientes han demostrado que la TNMD regula la autorenovación y la senescencia de las células precursoras de los tendones sugiriendo un papel importante en el nicho de células progenitoras de los tendones a través de la remodelación de la MEC (Alberton *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2019).

Los tenocitos, se consideran un grupo de fibroblastos especializados que, típicamente se encuentran organizados en filas en sentido longitudinal en asociación con las fibras de colágena (Passerieux *et al.*, 2007). En la década de 1990, se describió la existencia de una “memoria celular” debido que los fibroblastos aislados de los tendones, la córnea y piel en etapas fetales, aún bajo las mismas condiciones de cultivo, adoptan una organización semejante a la que tienen dentro del tejido del que fueron extraídas Sugiriendo que las células adquieren información en su contexto embrionario que se mantiene hasta etapas adultas y que, puede ser recreada en cultivos *in vitro* (Doane and Birk, 1991).

Marcadores moleculares de los tendones

Para rastrear selectivamente a los tenocitos a lo largo de todo el desarrollo embrionario, se han usado marcadores moleculares como *Tnmd* y *Tenacina-C (Tnc)*, que aunque se expresan fuertemente en los tendones, también se encuentran en los músculos (Kardon,

1998; Martini and Schachner, 1991). Debido a que *Tnmd* y *Tnc*, se expresan cuando los tenocitos ya se han diferenciado, son marcadores que han resultado útiles para esclarecer los procesos del ensamblaje del sistema musculo esquelético, cuya coordinación depende directamente los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) 4 y 8, y de la proteína morfogénica de hueso (BMP) 4 (Brent *et al.*, 2003; Edom-Vovard *et al.*, 2002; Edom-Vovard and Duprez, 2004; Havis *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2010; Tozer and Duprez, 2005).

Sin embargo, para explicar el origen de las células precursoras de los tendones, se ha propuesto otros marcadores que se expresan en etapas que anteceden al depósito de MEC. Entre los cuales se reconocen *Scleraxis (Scx)* y *Mohawk (Mwx)*, al receptor efrínico *Cek-8*, a los factores de respuesta temprana al crecimiento *Egr1* y *Egr2* (Anderson *et al.*, 2006; Cserjesi *et al.*, 1995; D'Souza and Patel, 1999; Gaut *et al.*, 2016; Lejard *et al.*, 2011a; Patel *et al.*, 1996; Schweitzer *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2016).

El factor de transcripción HLHb *Scx* se considera el marcador molecular más temprano para identificar las células precursoras de los tendones y ligamentos en todas las etapas del desarrollo (Cserjesi *et al.*, 1995; Schweitzer *et al.*, 2001). Aunque este marcador no es exclusivo para tendones y ligamentos ha resultado ser de gran utilidad para elucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo y reparación de los tendones (Brown *et al.*, 1999; Pryce *et al.*, 2007). *SCX* regula positivamente la transcripción de *Col1a1* (Furumatsu *et al.*, 2010; Léjard *et al.*, 2007; Murchison *et al.*, 2007), y *Tnmd* (Shukunami *et al.*, 2018). Además, *Scx* también se expresa en discos intervertebrales, articulaciones y el cartílago en inserciones tendinosas y ligamentosas (Brent *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2013). En etapas adultas, *Scx* es necesario para la reparación de los tendones y el estado diferenciado de los tenocitos (Sakabe *et al.*, 2018).

En el ratón mutante nulo de *Scx* mostró un fenotipo severo de tendones de acuerdo con su longitud y función. Los tendones más afectados fueron los extensores, que se tratan de transmisión de fuerza de la cola y las extremidades y, los tendones intermusculares. Mientras que los tendones de anclaje se afectaron moderadamente. Interesantemente, en los flexores se observó reducción del tamaño y desorganización de las fibras, mientras que los de anclaje óseo, como los intervertebrales y los ligamentos cruzados, se afectaron ligeramente (Murchison *et al.*, 2007). La afectación diferencial los tendones muestra que hay una regulación diferencial para establecer de la identidad de los tendones y ligamentos, a partir de los mismos precursores; sin embargo, *Scx* es un marcador que se expresa tanto en ligamentos como en tendones.

Poco después de iniciar la expresión de *Scx* en las células precursoras de los tendones, *Mwx* se expresa en zonas que se sobrepone con las zonas de expresión de *Scx* (Anderson *et al.*, 2006). Con el mutante de *Mwx* se demostró que este gen es fundamental para regular la síntesis de la MEC de los tendones (Ito *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015) y en su ausencia se observan calcificaciones heterópicas en el tendón de Aquiles (Suzuki *et al.*, 2016).

La expresión de *Cek8* se observa en las condensaciones de células asociadas con la formación de los tendones, conforme avanza el desarrollo la expresión de *Cek8* se restringe a las zonas donde los tendones se insertarán dentro del cartílago (Patel *et al.*, 1996). Se ha propuesto que *Cek8* está involucrado en coordinar señales dependientes del contacto célula-célula durante la tenogénesis, tales como la dirección topográfica de la proyección de estructuras citoplasmáticas de los tenocitos (D'Souza and Patel, 1999).

Los mutantes de factores *Egr1* y *Egr2*, son reguladores directos de la colágena I en las etapas posnatales de ensamblaje de las fibras de colágena miotendinosa y en los procesos de reparación (Gaut *et al.*, 2016; Guerquin *et al.*, 2013; Lejard *et al.*, 2011b). Si bien no tienen un fenotipo severo de tendones, se ha visto que además de la reducción de colágena, también reduce la expresión de otras moléculas asociadas como *Tnmd*, *Fmod*, *Dcn* y *Scx*, necesarias para la integración del sistema músculo esquelético (Alberton *et al.*, 2015; Lejard *et al.*, 2011a; Yoshimoto *et al.*, 2017).

En el desarrollo embrionario, expresión espaciotemporal de todos estos marcadores son coordinados por medio de “morfógenos” o superfamilias de proteínas que están constituidas por factores de crecimiento y diferenciación, como las vías de señalización TGF β y WNT.

Vías de señalización implicadas en el desarrollo de los tendones

Para determinar extensión del efecto producido por la activación de las vías de señalización en las células blanco deben considerarse siete variables. Primero, es el nivel de expresión del ligando por la fuente, que está altamente regulada por muchos elementos contextuales. Segundo, el subtipo del ligando cuya respuesta va a variar dependiendo de la afinidad que tenga al receptor. Tercero, el control de los ligandos por proteínas de la matriz que forman gradientes de difusión. Cuarto, los mediadores de la liberación de los ligandos mediante cambios conformacionales comúnmente dirigidos por contactos por integrinas. Quinto, la disponibilidad de proteínas antagonistas. Sexto, la presentación de ligandos que exponen a los receptores. Y por último, la combinación de los receptores que se expresan (Massagué, 2012). Sin embargo, el destino celular que adquiera una población celular en respuesta a esa señal depende únicamente de la historia en el desarrollo de esa población celular.

Vía de señalización TGFβ/SMAD

Los efectos de TGFβ pueden ser muy diferentes e incluso opuestos dependiendo del tipo celular y las condiciones de estudio. Aunque la vía es relativamente simple, la identificación de componentes, reguladores y la activación de vías alternas llevó a la conclusión de que el contexto celular es quien dicta la funcionalidad de la respuesta (Massagué, 2012).

La superfamilia de los TGFβ está compuesta por tres familias: los TGFβs, las activinas/inhibinas y las BMPs. Los TGFβ han mostrado tener una gran variedad de respuestas en la morfogénesis, desde el desarrollo embrionario temprano la proliferación, diferenciación, apoptosis y la síntesis de matriz extracelular (Massagué, 2012).

En mamíferos y aves existen tres isoformas TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3. La vía de señalización TGFβ se inicia con la unión de un ligando TGFβ a un receptor tipo II (TβRII), que forma un complejo de receptor serin/treonin cinasa se compone de dos receptores tipo II y dos receptores tipo I. En humanos existen siete receptores tipo I y cinco tipo II, la interacción entre las superficies moleculares determinan la especificidad de los pares de receptores, TGFβ se une exclusivamente al receptor tipo I (también conocido como cinasa Activin receptor-Like kinase 5 o ALK5) y el TGFBR2. Mientras que las Activinas, la inhibina Nodal y las BMP comparten los receptores de Activina 2A (ACVR2A) y ACVR2B. Las Activinas y Nodal comparten el receptor tipo I ACVR1 (también conocido como ALK2) y ACVR1B (también conocido como ALK4) y ACVR1C (también conocido como ALK7), mientras que BMPR1A (o ALK3) y BMPR1B (o ALK6) actúan como los receptores tipo 1 de las BMP. Y por último, ACVRL1 (o ALK1) actúa como receptor tipo 1 para BMP9 y BMP10, aunque se ha visto que también puede ser activado por altas concentraciones de TGFβ (Pardali *et al.*, 2010).

La transducción de la señal ocurre debido a que la unión de TGFβ induce que TβRII fosforile a TβRI, el cual puede a su vez activar cofactores de unión a ADN, co-activadores y co-represores. La activación de TβRI a su vez activa las proteínas Smad2 y Smad3, la fosforilación de estas proteínas promueve la oligomerización con Smad4, que es necesaria para activar la expresión de los genes blanco (Massagué, 1998). La activación génica mediada por SMADS requiere de los coactivadores como CBP y p300, mientras que la represión ocurre por la interacción con los correpresores nucleares SnoN y Ski (Band and Laiho, 2012; Gareth J Inman *et al.*, 2002; Stroschein *et al.*, 1999).

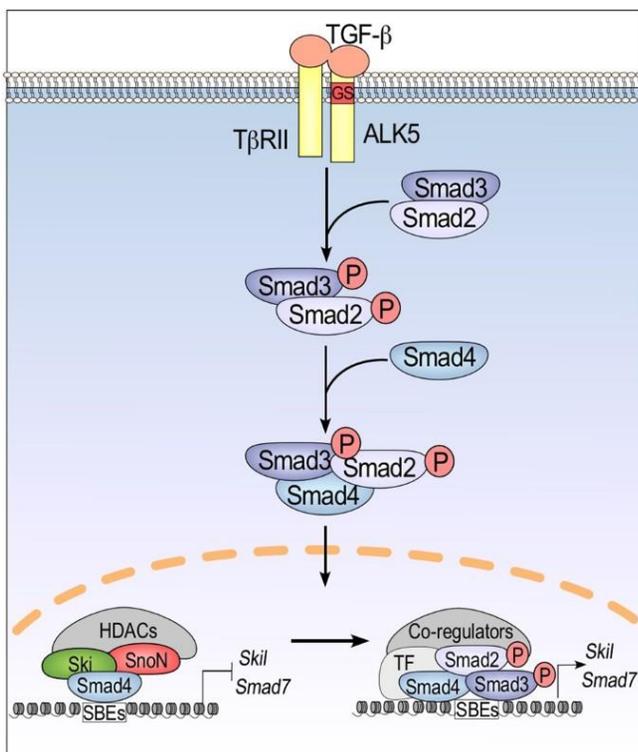


Figura 2. Regulación de la vía de señalización TGFβ/Smad por Ski and SnoN. En ausencia de TGFβ, las proteínas Ski and SnoN interactúan con Smad4 para inhibir la expresión de los genes blanco de TGFβ, como *Smad7* and *Skil*, mediante la unión de la HDACs a sus promotores. Después, TGFβ induce la fosforilación de las proteínas Smad2/3 para formar un complejo con R-Smad/Smad4 y, asociarse con factores de transcripción específicos y otros cofactores para modular la expresión de sus genes blanco. Tomado de: *Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF-β/Smad signaling pathway in health and disease.* (Tecalco-Cruz *et al.*, 2018).

Existen otros elementos que regulan tanto la activación genética por SMAD, así como el recambio de moléculas SMAD en los complejos de transcripción. La regulación negativa es provista por SMAD7, cuya expresión es inducida por SMAD, y esta a su vez recluta SMURF

para la poliubiquitinación y subsecuentemente a la degradación por endocitosis de los receptores de TGF β (Massagué, 2012).

En tejido adulto, TGF β está estrechamente asociado a la formación de tejido conjuntivo por su capacidad de formar matriz extracelular en procesos normales y en la fibrosis (Massagué, 2012; Wu *et al.*, 2016). Por otro lado, los procesos como diferenciación, proliferación y apoptosis en el desarrollo del sistema musculoesquelético se coordinan a través de la regulación y la función de la señalización TGF β .

En los embriones de pollo, los ARNm *Tgf β 1*, *Tgf β 2* y *Tgf β 3* colocalizan en la notocorda, el tubo neural, el dermomiótomo, el esclerotomo y el mesodermo lateral (**Fig. 3**). En la extremidad embrionaria de pollo, *Tgf β 2* se observa desde etapas tempranas (19-22HH) en toda la extensión del mesénquima de la extremidad, sin embargo, la expresión es más fuerte en las regiones cercanas al ectodermo que en el centro, donde se formarán los elementos esqueléticos. En las etapas 23-24HH la expresión se concentra en las regiones ventral y dorsal de la extremidad y se observa una expresión ligera en la cresta ectodérmica apical (CEA), que es la región más distal de la extremidad. De la etapa 26HH en adelante *Tgf β 2* se observa en la punta de los dedos en desarrollo (Gañan *et al.*, 1996; Jakowlew *et al.*, 1994; Merino *et al.*, 1998). *Tgf β 3* se expresa ligeramente en toda la extensión de la extremidad desde etapas tempranas, hasta que en la etapa 24HH se concentra mayormente en las regiones dorsal y ventral, donde se posicionarán las masas musculares. En cuanto a *Tgf β 1*, se puede observar en etapa 26HH la señal es muy tenue y distribuida inespecíficamente a lo largo de toda la extremidad. En la etapa 29HH se ubica en el interdígito, donde *Tgf β 2* y *Tgf β 3* no se expresan (Jakowlew *et al.*, 1994; Lorda-Diez *et al.*, 2010).

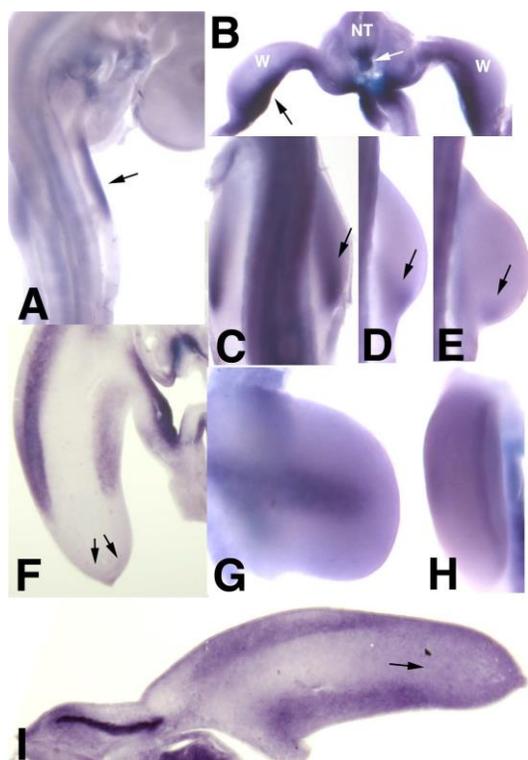


Figura 3. La expresión génica de *Tgfb* en las extremidades en desarrollo. (A-H) Análisis de la expresión de *Tgfb2* mediante hibridación *in situ*. (A) Hibridación *in situ* de embrión completo en etapa 18HH mostrando transcritos de *Tgfb2* a la altura de la extremidad en el mesodermo somítico en el flanco de los embriones (flechas) (B) Corte transversal obtenido con vibratomo al nivel del primordio del ala (W) de un embrión en etapa 19HH; marcaje intenso en la somatopleura y en el mesénquima de la extremidad (flecha negra). Nótese los transcritos de *Tgfb2* en la placa del tubo neural (NT) y la notocorda (flecha blanca). (C-E) Vistas detalladas del primordio del ala en etapas HH20 (C), HH21 (D), and HH22 (E) mostrando el dominio de expresión de *Tgfb2* en el mesénquima del margen posterior del primordio (flechas). (F-H) Los dominios de expresión de *Tgfb2* en etapa 24HH en el mesodermo dorsal and ventral y en la cresta ectodérmica apical (CEA). (F) Corte longitudinal del primordio de ala obtenido por vibratomo mostrando una acumulación intensa de transcritos en el mesodermo dorsal y ventral asociado con las masas premusculares y, una expresión tenue en el mesodermo distal indiferenciado (flechas). (G and H) especímenes de extremidad completa ilustran el dominio de la expresión dorsal (G) y el de la CEA (H). (I) Cortes longitudinales de ala en etapa 24HH mostrando la expresión de *Tgfb3* en las regiones dorsal and ventral que delimitan el territorio ocupado por las masas musculares. Nótese la expresión tenue en el mesodermo indiferenciado (flecha) Tomado de: *Tgf2 and 3 are coexpressed with their extracellular regulator Ltbp1 in the early limb bud and modulate mesodermal outgrowth and BMP signaling in chicken embryos.* (Lorda-Diez *et al.*, 2010).

Para analizar las funciones de los ligandos TGF β , se generaron ratones mutantes de los genes *Tgfb1-3* (Bottinger *et al.*, 1997; Dünker and Krieglstein, 2000) y sus receptores (Dudas *et al.*, 2006) teniendo efectos en numerosos procesos en la formación del esqueleto. El fenotipo del mutante de *Tgfb1* es letal debido a inflamación difusa, los animales mueren al mes de edad, este modelo se ha utilizado para estudiar enfermedades autoinmunes y cáncer (Dünker and Krieglstein, 2000; Kulkarni *et al.*, 1993). Los fenotipos del mutante de *Tgfb2* presentan malformaciones cardíacas, pulmonares, craneofaciales, en extremidades, columna vertebral, ojo, oído interno, y tracto urogenital. Los homocigotos nulos mueren poco después de nacer. Los defectos óseos incluyen una reducción general en el tamaño de los huesos y

defectos de osificación. Las extremidades se observan rotadas, el radio y la ulna se acortan, mientras que la extensión de los huesos está reducida o elementos faltantes. También se observan falta de fusión en la línea media en las vértebras lumbares y torácicas, defectos en el esternón, curvaturas anormales de las costillas y defectos de cierre del paladar (Sanford *et al.*, 1997). Los fenotipos del mutante de *Tgfb3* son letales, mueren a las 24 horas de nacidos debido a que presentan paladar hendido y no pueden alimentarse (Proetzel *et al.*, 1995). Se han generado diversos mutantes para T β RII, que incluyen diversos fenotipos esqueléticos como el acortamiento de los huesos, la fusión de las articulaciones, reducción en la densidad ósea, bifurcación del proceso xifoides y el esternón (Baffi *et al.*, 2004; Baffi *et al.*, 2006; Chytil *et al.*, 2002; Dünker and Krieglstein, 2000; Longobardi *et al.*, 2012; Proetzel *et al.*, 1995; Sanford *et al.*, 1997; Seo and Serra, 2007; Spagnoli *et al.*, 2007).

El papel de TGF β en los tejidos conjuntivos tomó interés al analizar la falta de estructuras como la tuberosidad deltoidea que dependen de la activación mecánica del sistema musculoesquelético aunado a los fenotipos donde se fusionan las articulaciones (Seo and Serra, 2007; Spagnoli *et al.*, 2007). Además de la atrofia severa de las extremidades, los doble mutantes *Tgfb2*^{-/-}; *Tgfb3*^{-/-} presentan pérdida de la mayoría de los tendones y ligamentos de las extremidades, tronco, cola y cabeza. Interesantemente, la inducción de Scx en E9.5 ocurre correctamente, pero a partir de E12.5 se pierde progresivamente en la región ventral, sin embargo, la expresión dorsal de Scx se mantiene normalmente. En los mutantes *TgfbR2*^{PrxCre} se observa un fenotipo más radical, con pérdida de Scx en E10.5 que afecta tanto la expresión dorsal y ventral de Scx, y la fusión de articulaciones (Pryce *et al.*, 2009) (**Fig. 4**). Notablemente, la condensación del cartílago no se afecta (Seo and Serra, 2007).

Demostrando que TGF β es necesario para el reclutamiento y mantenimiento de las células precursoras de los tendones de las extremidades.

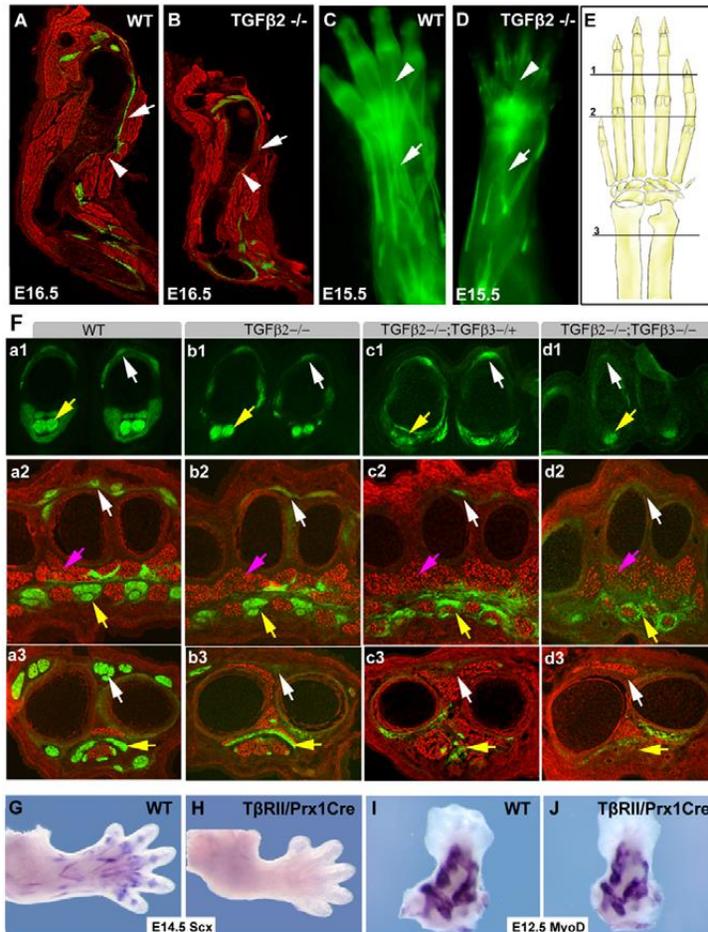


Figura 4. Pérdida de la señal tenogénica ScxGFP en series alélicas de los alelos nulos Tgfb2^{-/-} y Tgfb3^{-/-}. Los tendones se visualizaron usando el reportero transgénico ScxGFP y las secciones se contratiñeron con anticuerpo de MHC. (A, B) Cortes sagitales de las extremidades anteriores de un embrión silvestre en etapa E16.5 y un Tgfb2^{-/-} de la misma camada. Las cabezas de flecha blancas señalan la tuberosidad Deltoide normal en A, y su ausencia en B; las flechas blancas indican el tendón Deltoide (A) y su ausencia en (B). (C, D) Tendones extensores de un embrión silvestre de etapa E15.5 y de un Tgfb2^{-/-} de la misma camada. Las flechas blancas indican el extensor digitorium en C y su ausencia en D; las cabezas de flecha blancas indican los tendones extensores de los dígitos. (E) Representación esquemática de la extremidad

anterior. El sitio de las secciones que se muestran en F son: 2 1, dígitos; 2, metacarpos; 3, proximal a la muñeca. (F) Los cortes transversales de la extremidad anterior de embriones en etapa E14.5 de series alélicas de los alelos nulos de los ratones mutantes de Tgfb2 y Tgfb3. Cada panel está sub indexado con una letra que denota cada genotipo: a, silvestre; b, Tgfb2^{-/-}; c, Tgfb2^{-/-};Tgfb3^{+/-}; d, Tgfb2^{-/-};Tgfb3^{-/-}. El numeral en cada panel indica el plano de la sección correspondiente en E. Las flechas blancas indican los tendones extensores; flechas amarillas, tendones flexores; flechas rosadas, músculos. (G-J) HIS de extremidad completa tipo silvestre y embrión Tgfb2^{-/-}Prx1Cre usando una sonda de Scx en etapa E14.5 (G,H) una sonda de MyoD en etapa E12.5 (I,J) Tomado de: Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGF β signaling are essential for tendon formation. (Pryce et al., 2009).

Por otro lado, en cultivos de micromasas obtenidos de extremidades embrionarias de pollo, se ha reportado que se promueve la condrogénesis al agregar TGF β exógeno (Chimal-Monroy and De León, 1997; Schofield and Wolpert, 1990); sin embargo hay estudios que reportan el efecto contrario (Chen *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Seo and Serra, 2007; Tsuiki and Kishi, 1999). El efecto dual de los TGF β sobre la condrogénesis se ha relacionado con la etapa de diferenciación de las células en el momento que se realiza el tratamiento, sin embargo, el mecanismo que regula esta dualidad empieza a ser elucidado.

Interesantemente, cuando se agrega TGF β a los cultivos de micromasas en etapas donde inicia la diferenciación condrogénica los cultivos se transforman formando una lámina de tejido fibroso (**Fig. 5**) (Lorda-Diez, Montero, *et al.*, 2009; Rifkin, 2005).

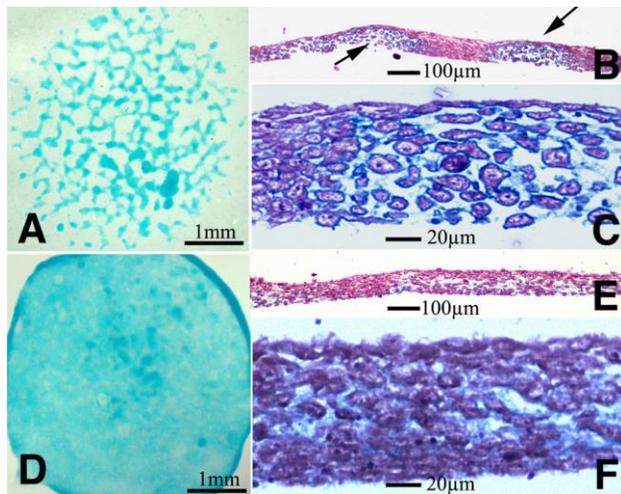


Figura 5. Efecto de TGF β exógeno en cultivos de micromasas de mesénquima de extremidad. Cultivos de micromasas de cinco días, representando del control (A–C) y en cultivos tratados con TGF β 1 al principio del día 3. A muestra el patrón nodular característico de los cultivos control en teñidos con azul Alciano. B and C son cortes semifinos para mostrar la presencia de cartílago en el cultivo. B es una vista de poco aumento que muestra dos nódulos de cartílago (flechas) separados por un tejido fibroso. C es una vista detallada de un nódulo de cartílago que muestra la morfología redondeada de los condrocitos y la matriz extracelular positiva a azul Alciano. D–F ilustra la morfología de las micromass

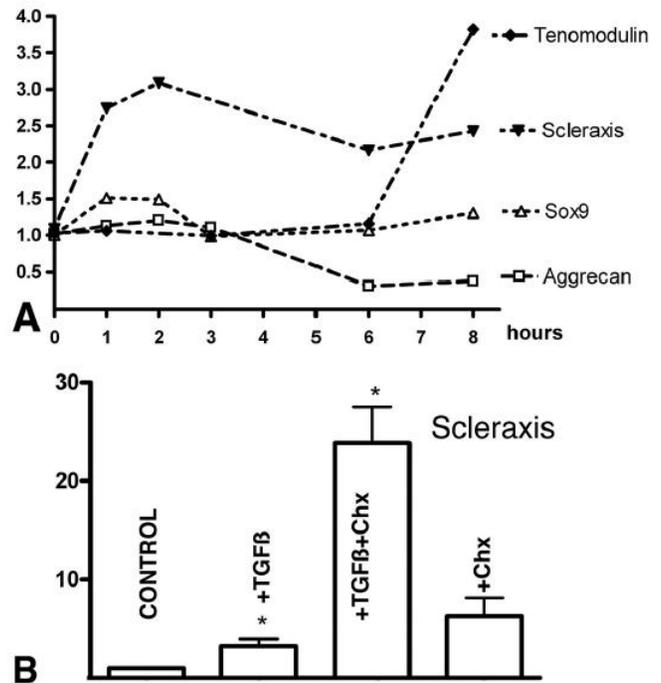
experimentales para mostrar la ausencia de nódulos de cartílago. Nótese la tinción uniforme y débil con azul alciano en D y el aspecto fibroso del tejido en cortes semifinos (E and F) Tomado de: *Transforming growth factors β coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme*. (Lorda-Diez *et al.*, 2010).

La formación de tejido fibroso en cultivos se acompañaba del aumento en la expresión de *Scx* y *Tndm* y la disminución de *Agrecano* y *Sox9*; además, los tratamientos diseñados para bloquear la señalización de SMAD resultaron en la formación de nódulos condrogénicos al

agregar TGF β , indicando que las modificaciones del perfil de expresión de los marcadores de destino celular depende de mecanismos independientes de TGF β (Fig. 6) (Lorda-Diez, Montero, *et al.*, 2009; Rifkin, 2005).

Figura 6. Curso temporal de la regulación genética de los factores e diferenciación por TGF β y sus moduladores.

A muestra los niveles de expresión génica relativos de *Aggrecan*, *Sox9*, *Scx*, y *Tnnd* cuantificados por qPCR en las primeras 8-h después de agregar TGF β 1 (10 ng/ml) a cultivos de micromasas de 3 días. La expresión de cada gen en cultivos control se usó para la calibración. Nótese el aumento en la expresión de *Scleraxis* desde la primera hora después del tratamiento. B, los niveles de expresión de *Scleraxis* cuantificados por qPCR en cultivos de micromasas tratados durante 2 h al principio del día 3. Las barras de izquierda a derecha corresponden a los niveles de expresión en cultivos; cultivos tratados con 10 ng/ml de TGF β 1; cultivos tratados con 10 ng/ml TGF β 1 30 min después de agregar 20 μ g/ml de cicloheximida; y los cultivos tratados con 20 μ g/ml de cicloheximida. Nótese el aumento dramático en la expresión de *Scleraxis* cuando el tratamiento de TGF β en combinación con el inhibidor de síntesis de proteína por cicloheximida, sugiriendo la existencia de un modulador represor de TGF β -sobre la expresión de *Scleraxis*. *, $p < 0.05$



el tratamiento de TGF β en combinación con el inhibidor de síntesis de proteína por cicloheximida, sugiriendo la existencia de un modulador represor de TGF β -sobre la expresión de *Scleraxis*. *, $p < 0.05$ Tomado de: *Transforming growth factors β coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme.* (Lorda-Diez *et al.*, 2010).

WNT/ β -catenina en la tenogénesis.

Las proteínas WNT funcionan como morfógenos que regulan diversos procesos del desarrollo proliferación, especificación y diferenciación (Clevers and Nusse, 2012). Los ligandos WNT pertenecen a una familia de glicoproteínas que se unen a un complejo de receptor que consiste en un receptor de siete dominios transmembranales codificada por los genes Frizzled (Fz) unido a un co-receptor LRP5/6 (Akiyama, 2000; Bhanot *et al.*, 1996). La

vía canónica de señalización WNT se caracteriza por la regulación de la fosforilación de β -catenina.

En ausencia de WNT, los niveles de β -catenina citosólica libre se mantienen bajos a través la del complejo de la glicógeno sintasa cinasa (GSK3 β), también llamado complejo de degradación de β -catenina (Peifer *et al.*, 1994). Para el ensamblaje del complejo de degradación, se requiere de Axina2, una proteína andamiaje que tiene dominios para interactuar con la proteína supresora de tumores, adenomatous polyposis coli APC, la casein cinasa CK1 α , GSK3 β y β -catenina simultáneamente (Jho *et al.*, 2002; Kikuchi, 1999).

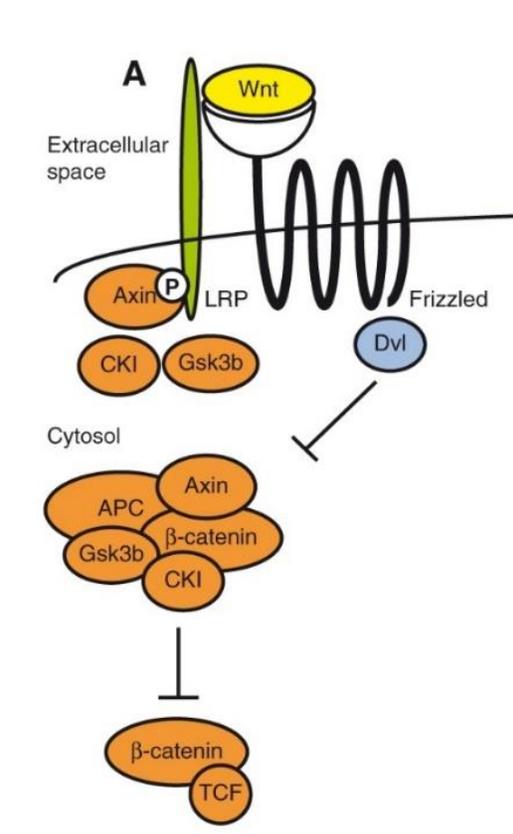


Figura 7. Las proteínas WNT y sus compañeros de interacción.

Dependiendo de la etapa del desarrollo, así como el tejido y el tipo celular, las proteínas WNT (los diferentes miembros representados en azul y amarillo) pueden interactuar con múltiples compañeros que determinan la respuesta de la célula que recibe la señal. La mayoría de los componentes de transducción de la señalización WNT no son exclusivos para una respuesta intracelular única. Las proteínas que promueven la actividad de WNT-Frizzled están representadas en verde; las proteínas que impiden la actividad de WNT-Frizzled están representadas en rojo. (A) Las proteínas WNT pueden interactuar con una variedad de receptores de la superficie celular, incluidos los miembros de la familia de los receptores Frizzled. Para que la señalización mediada por β -catenina/TCF sea favorecida, el co-receptor LRP debe ser reclutado al complejo WNT-Frizzled. La disponibilidad de LRP se determina por el balance entre su internalización y su presentación en la membrana plasmática (mediado por DKK y Kremen). Tomado de: *Towards an integrated view of WNT signaling in development*. (van Amerongen and Nusse, 2009).

La fosforilación secuencial de β -catenina por CK1 α y posteriormente, por GSK3, crean un sitio de unión para ubiquitina ligasa E3, esto conlleva a la ubiquitinación y degradación de β -catenina (Aberle *et al.*, 1997; Stamos and Weis, 2013). La unión de WNT a su receptor activa a Dishevelled (Dvl), una proteína cuya fosforilación produce un cambio en el complejo de degradación, esto permite la acumulación de β -catenina y, en consecuencia su traslocación al núcleo donde forma complejos con los factores de transcripción de la familia TCF/LEF y activa la transcripción genética (Labbe *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2012) (**Fig. 7**).

Entre los genes blanco están *Axina2*, *DKK1*, *Sostdc1*, *N-Myc* y *Ciclina-D* (ten Berge *et al.*, 2008; Jho *et al.*, 2002). La vía WNT/ β -catenina se autoregula negativamente a través de *Axina2*, *DKK* y *Naked*, y la supresión de sus receptores Fz y LRP5/6 (Geetha-Loganathan *et al.*, 2010). La actividad de LRP5 regula positivamente la proliferación osteoblástica, mientras que *SOST* y *DKK1*, regulan negativamente la formación de hueso antagonizando a LRP5 (Williams and Insogna, 2009). La proteína *DKK* se considera un antagonista directo de la señalización WNT/ β -catenina debido a que impide la dimerización con LRP5 para formar el complejo del receptor con Fz (Semenov *et al.*, 2005). *DKK1* se une con una alta afinidad a LRP6, junto con *Kremen* se forma un complejo lo que induce la formación de caveolas que regulan la internalización y degradación de LRP6 (Bourhis *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

Se ha descrito genes blanco de la señalización WNT/ β -catenina que están involucrados en la formación de tejido conjuntivo. La regulación de *Axina2* es importante para el establecimiento del tejido conjuntivo de las articulaciones (Dao *et al.*, 2007; Jho *et al.*, 2002) y también juega un papel importante en las enfermedades fibróticas, mediadas por TGF β (Gillespie *et al.*, 2018). Característicamente, *Axina2* es uno de los principales genes blanco y, en su forma

proteica sirve de andamiaje para ensamblar el complejo de degradación de β -catenina, deteniendo la vía de señalización (Nusse and Clevers, 2017).

Por otro lado, el gen *N-myc* es un oncogen que forma parte de los genes blanco de la vía WNT/ β -catenina (Logan and Nusse, 2004), juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario ya que las mutaciones en este gen son letales, en general debido a una falla de la proliferación de las células de la mayoría de los órganos (Knoepfler *et al.*, 2002; Okubo *et al.*, 2005). Por el contrario, la expresión forzada, lleva a la proliferación no controlada y a la tumorigénesis (Nilsson and Cleveland, 2003). Las extremidades de los mutantes nulos para *N-myc* son pequeñas y presentan fallas para desarrollar los elementos esqueléticos del autópodo, esto principalmente debido a la reducción de la proliferación. Aunado a esto, se pierde la muerte celular programada y se favorece la formación de tejido conjuntivo (Ota *et al.*, 2007; Sawai *et al.*, 1993).

Entre los genes de la familia WNT que se expresan en el mesénquima de la extremidad, WNT9A es un ligando que implicado en la inducción de las células de la interzona en las etapas previas a la segmentación del cartílago. La expresión ectópica de *Wnt9A* en extremidades embrionarias de pollo inducen cambios moleculares y morfológicos en etapas de tempranas de la formación de las articulaciones (Hartmann and Tabin, 2001). Los ratones deficientes de *Wnt9A* muestran un fenotipo en articulaciones relativamente ligero, como la metaplasia condroide, la fusión parcial de los elementos del metatarso en el pie y los carpos de la muñeca (Später *et al.*, 2006). La sobre expresión de *Wnt9A*, al igual que la sobre expresión de β -catenina, inducen la diferenciación temprana de los condrocitos, lo que produce una formación ectópica de articulaciones (Guo *et al.*, 2004). Indicando que *Wnt9A*

es necesario para suprimir la identidad de los condrocitos y mantener la de las células del tejido conectivo de las articulaciones.

Interacción de las vías de señalización WNT y TGF β

En muchos sistemas se ha visto que las miembros de las vías de señalización WNT/ β -catenina y TGF β /SMAD interactúan para la especificar e inducir el destino celular mesenquimal (Labbe *et al.*, 2000; Letamendia *et al.*, 2001; Massagué, 2012) (**Fig. 8**).

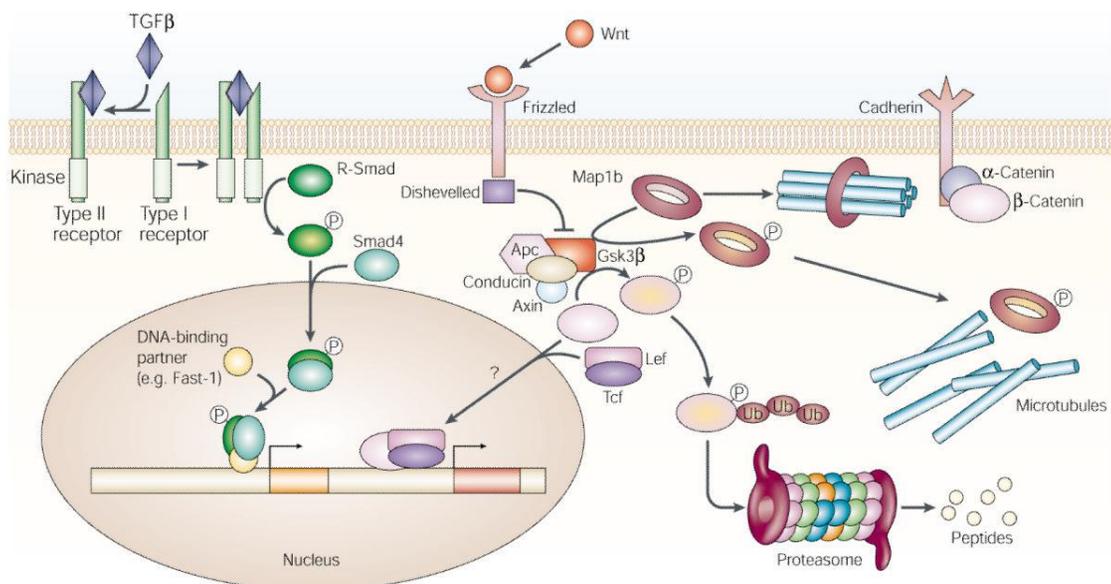


Figura 8. Las vías de señalización WNT and TGF β . La unión del Factor de crecimiento Transformante- β (TGF β) produce la heterodimerización de los receptores tipo I y tipo II. El receptor tipo II se activa el receptor tipo I por fosforilación. En consecuencia, el receptor tipo I fosforila las R-Smads, que transducen la señal hacia el núcleo vía la co-Smad, Smad4. El complejo R-Smad/Smad4 se une a una gran variedad de factores de transcripción que están regulados durante el desarrollo para dirigir la expresión génica. La unión de WNT a los receptores Frizzled llevan a la fosforilación de Dishevelled. Esta fosforilación de Dishevelled inhibe la formación del complejo Apc (adenomatous polyposis coli)-Axin-Conducin-Gsk3 β (glycogen synthase kinase 3 β), que, en ausencia de la señal WNT, señala la degradación de β -catenin. En contraste, la unión de WNT al receptor Frizzled estabiliza la β -catenin citoplasmática, que se agrega al complejo de los factores de transcripción formado por los factores de transcripción Lef/Tcf (factor lymphoid enhancer-binding factor/T-cell factor) que inician la transcripción de los genes blanco de WNT. La vía de señalización WNT puede modular el dinamismo del citoesqueleto. En ausencia de la señalización WNT, Gsk3 β fosforila la proteína asociada a microtúbulos- 1b (Map1b), lo que desestabiliza los haces de microtúbulos. La señalización WNT inhibe a Gsk3 β para mantener estable la red microtubular. Ub, ubiquitination. Tomado de: *Wnts and TGF β in synaptogenesis: Old friends signalling at new places.* (Packard *et al.*, 2003).

En términos generales, se ha visto que en células mesenquimales WNT3A y TGF β inducen un perfil de expresión distinto al que tienen las vías individualmente, inducen genes mediadores de apoptosis, estimulan la producción de matriz extracelular, diferenciación celular y la respuesta al daño al DNA (Crease *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010).

En niveles bajos de TGF β , Axina2 y GSK3 β forman un complejo citosólico con SMAD3. La SMAD3 inactiva es ubiquitinada y reclutada a degradación proteosómica, en una manera similar al complejo de degradación de β -catenina (Furuhashi *et al.*, 2001; Jian *et al.*, 2006). De esta manera, Axina2 y GSK3 β modulan cooperativamente el recambio de SMAD3 y la degradación de β -catenina, favoreciendo la activación de la señalización canónica de WNT (Guo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Zhou, 2011).

Con construcciones de reporteros de transcripción, se encontró otro punto de interacción donde Smads2/3/4 forman complejos con Axina para funcionar como promotores de transcripción con TEF/LEF (Warner *et al.*, 2005). En presencia de TGF β , SMAD3 se libera del complejo Axina y se recluta hacia el receptor T β RI, llevando a un cambio en el perfil de expresión génica aumentando la expresión génica de Axina2, DKK y Cadherina-6, (Furuhashi *et al.*, 2001; Labbe *et al.*, 2000; Letamendia *et al.*, 2001; Warner *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). Otro posible mecanismo que favorece la activación de los genes blanco de TGF β es que Axina2 también promueve la degradación de Smad7 (Liu *et al.*, 2006).

En los procesos de fibrosis por producción excesiva de MEC se ha encontrado que la señalización WNT tiene una alta respuesta, por lo que se ha estudiado su papel en la iniciación y mantenimiento del tejido fibroso (Beyer *et al.*, 2012; Dees *et al.*, 2014; Hamburg-Shields *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2011).

En los cultivos derivados de tendón de ratas, la activación de WNT/ β -catenina disminuye la transcripción de *Smad2* y *Smad3* lo que lleva a la inhibición de la expresión de *Scx*, *Mwx* y *Tnmd*; mientras que con las mismas condiciones de cultivo la adición de TGF β no modifican la expresión de *Axina2* (Kishimoto *et al.*, 2017).

MARCO TEÓRICO

La formación de los tendones de las extremidades un proceso conservado entre especies. Un componente esencial de los sistemas musculoesqueléticos es el anclaje de los músculos hacia el esqueleto en vertebrados y al exoesqueleto en invertebrados (Schweitzer *et al.*, 2010).

Desde organismos como las moscas, el ectodermo juega un papel importante para la inducción de los tendones y en el ensamblaje del sistema musculo esquelético (Volk, 1999). Estas células comparten propiedades funcionales con los tendones de vertebrados, incluyendo su naturaleza elástica y la inducción de la unión miotendinosa.

La conexión entre músculos, tendones y huesos es crucial para la locomoción del organismo, puede originarse por diversos mecanismos. Primero, el desarrollo paralelo e independiente de cada tejido, seguido de la inducción de la conexión entre los tendones y sus contrapartes. Segundo, en un mecanismo alternativo una inducción independiente de cada tejido, que puede ocurrir como en el primer escenario pero que sólo las células que están correctamente conectadas pueden completar su diferenciación hacia músculos, tendones y huesos. En un tercer posible mecanismo, las células que inician un programa de diferenciación (cartílago) podrían transdiferenciarse hacia un destino celular distinto (tendones).

El desarrollo del sistema musculoesquelético en embriones vertebrados genera un esqueleto cartilaginoso y la naturaleza multicelular de los tendones que conectan los músculos a sus inserciones esqueléticas. Las observaciones directas de los eventos tempranos de la formación de los tendones se hicieron posibles por el hallazgo de *Scx* (Brent *et al.*, 2003; Cserjesi *et al.*, 1995; Schweitzer *et al.*, 2001).

Contexto embrionario del desarrollo de los tendones de las extremidades

Las extremidades emergen de los flancos de los embriones como protuberancias llamadas “primordios” que contienen células mesenquimales cubiertas por un epitelio ectodérmico (Cohn and Tickle, 1996; Rubin and Saunders, 1972). El crecimiento de las extremidades ocurre bajo la dirección de las señales que emanan de ectodermo de la región más distal de la extremidad, llamada cresta ectodérmica apical (CEA) a través de la señalización de los morfógenos WNT y FGF (Wolpert, 1990).

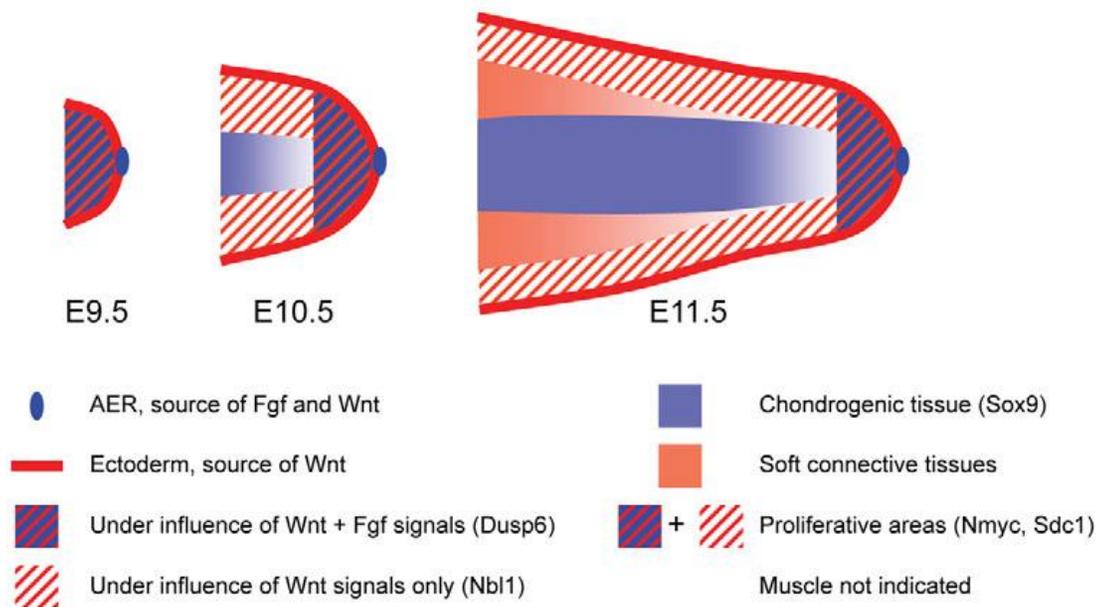


Figura 9. Las vías de señalización WNT y FGF interactúan para coordinar el crecimiento y la especificación del destino celular durante el desarrollo de las extremidades. En los primordios de las extremidades recién establecidos (E9.5), las proteínas WNT and FGF señalizan a lo largo del mesénquima de la extremidad para mantener las células en un estado multipotente y proliferativo (indicado por un entramado rojo/azul) marcado por Axin2 and Dusp6). Después, durante el crecimiento de la extremidad las células en el centro de las extremidades quedan alejadas del rango de esta señalización. Esto permite el arresto del ciclo celular y la expresión de Sox9, lo que lleva al establecimiento del núcleo condrogénico (indicado en azul, marcado por Sox9). En la periferia, las células que están fuera del rango de FGF de la AER pero que todavía están dentro del rango de acción de WNT del ectodermo (indicado por un sombreado rojo, marcado por Nbl1), mantiene el estado proliferativo en un nivel bajo y reespecifica las células hacia destinos del tejido conectivo blando. Como resultado, se forma un órgano extendido proximodistalmente con una punta multipotente de rápido crecimiento y un núcleo condrogénico rodeado por tejidos conectivos blandos. Tomado de: *Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development.* (ten Berge et al., 2008).

Conforme avanza el desarrollo las células mesenquimales que se alejan de la CEA, pueden entrar a un programa diferenciación. En el centro de la extremidad inicia la condrogénesis, mientras que las células mesenquimales que se encuentran en contacto con el ectodermo dorsal y ventral (ED y EV, respectivamente) se mantienen en un estado indiferenciado debido a la señalización WNT procedente de los ED y EV (ten Berge *et al.*, 2008; Geetha-Loganathan *et al.*, 2008; Tabin and Wolpert, 2007) (**Fig.9**)

Particularmente, los tendones del autópodo se desarrollan de manera independiente de su sitio de inserción y se unen a sus contrapartes musculares en etapas más tardías. En la extremidad, se pueden distinguir tres pares de primordios de tendones en asociación con las articulaciones más importantes. Un par en la zona proximal que está en la unión entre el estilópodo (que corresponde al brazo o al muslo) y el zeugópodo (que corresponde a la al antebrazo o a la pantorrilla); un par intermedio que aparece en la zona dorsal y ventral de la unión del zeugópodo y el autópodo (que corresponde a la mano o al pie) y el tercer par, los primordios distales que se localizan en donde se formarán los tendones de los dígitos (Kardon, 1998) (**Fig. 10**).

Una vez que se establece la formación de los elementos esqueléticos en el centro del autópodo, el primer indicio de la formación de los tendones se observa entre los elementos esqueléticos y el ectodermo dorsal y ventral (Hurle *et al.*, 1989).

En el autópodo existen tendones extensores que van por la parte dorsal y los flexores por la parte ventral. Los tendones dorsales del autópodo están compuestos por: el extensor superficial común de los dedos y los extensores individuales de cada dedo (Schweitzer *et al.*, 2001). Para la formación de estos tendones, aparece una estructura llamada “lámina del

mesénquima”, un andamio de matriz extracelular donde las células mesenquimales precursoras de los tendones se condensarán para establecer los blastemas de los tendones (Hurle *et al.*, 1990).

En el mesénquima que se encuentra en contacto con el ectodermo, *Scx* es inducido en las células progenitoras de los tendones que se alinean entre el músculo y el cartílago; las células *Scx*⁺ forman condensaciones que, en etapas posteriores se diferencian en las regiones proximales se segmentan para formar tendones individuales (Murchison *et al.*, 2007; Sakabe *et al.*, 2018; Schweitzer *et al.*, 2001; Sugimoto *et al.*, 2013).

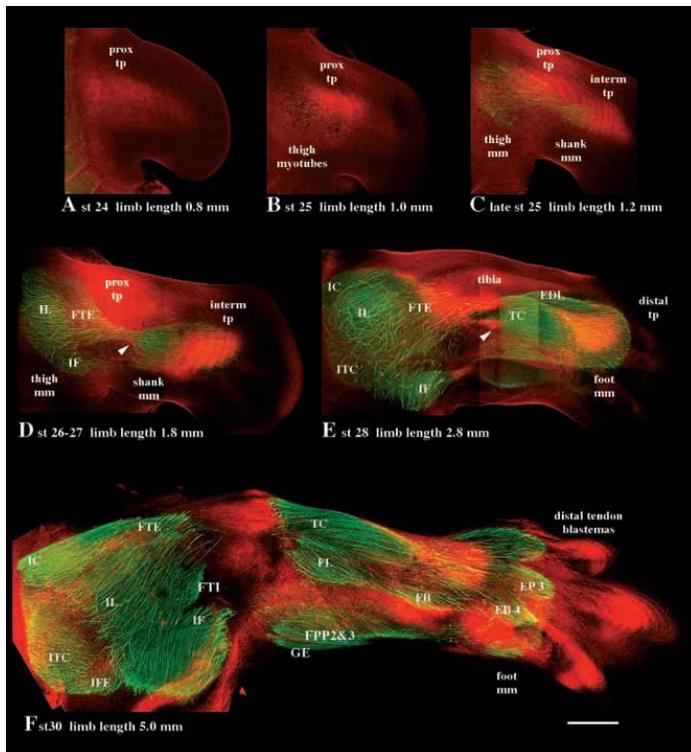


Figura 10. Vista dorsal de la extremidad posterior de pollo durante la morfogénesis de los músculos y los tendones.

Cada panel representa una reconstrucción de secciones ópticas mostrando el lado dorsal de una extremidad posterior derecha. La parte anterior de la extremidad está orientada hacia la parte superior y la parte distal hacia la derecha. En verde el anticuerpo F59 contra MHC rápido; en rojo el anticuerpo HB1 contra Tenascina. Barra de escala, 400 μ m. (A) Etapa 24HH. El primordio del tendón proximal dorsal es visible en la extremidad antes de la diferenciación de los miofibrilos, mientras que los miofibrilos axiales ya se han diferenciado (izquierda). (B) Etapa 25HH. Los miofibrilos de la masa muscular del muslo son visibles proximales al primordio del tendón. (C) Etapa 25HH tardía. El primordio del tendón intermedio es visible, proximal al primordio del tendón proximal se alinea la

masa muscular del muslo; entre los primordios del tendón proximal e intermedio se ubica la masa muscular de la pantorrilla. (D) Etapa 26-27HH. Dentro de la masa muscular de la pantorrilla, se empieza a formar el EDC (punta de flecha). Los miofibrilos se orientan prefigurando el límite de los compartimentos que separarán la masa muscular del muslo. (E) Etapa 28HH. Las masas musculares del muslo y la pantorrilla se han segregado en músculos anatómicamente distintos y en contacto y a la par de la segregación de los tendones de origen e inserción. Las puntas de flecha indican el origen del EDC. El primordio del tendón dorsal distal es apenas visible, superficial a los metatarsianos y distal a la masa muscular del pie. (F) La mayoría de los músculos dorsales del muslo, la pantorrilla y el pie se han segregado claramente en músculos individuales en contacto con sus tendones. Tomado de: *Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. Development.* (Kardon, 1998).

Diferenciación mesenquimal hacia el linaje tenogénico.

La organización de los primordios de los tendones del autómodo ha generado especial interés debido a que, a diferencia de tendones de otras regiones, su establecimiento es independiente de la aparición de los elementos esqueléticos (Hurle *et al.*, 1989; Hurle *et al.*, 1990; Kardon, 1998); este modelo también ha llamado la atención para el estudio los eventos que conllevan a la inducción del mesénquima hacia el destino tenogénico (Blitz *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015).

Los tendones se desarrollan en estrecha coordinación con la formación del esqueleto, donde los precursores del cartílago expresan *Sox9* (Healy *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 1997). En etapas tempranas del desarrollo de las extremidades, la expresión de *Sox9* en el mesénquima inicia en etapas más tempranas que la de *Scx*.

Al inicio del programa de diferenciación condrogénica, *Sox9* desencadena una cascada de activación de los genes de diferenciación del cartílago que, se mantiene activa por la expresión de los factores de transcripción *Sox5* y *Sox6* (Akiyama *et al.*, 2002; Lefebvre *et al.*, 2001; Smits and Lefebvre, 2003). La expresión de *Sox5/6* se co-expresan en las células del mesénquima donde se formarán los elementos esqueléticos, mientras que *Scx* se observa en la periferia, en las poblaciones celulares que formarán ligamentos y tendones. El patrón alternado entre *Sox5/6* y *Scx* sugirió que la formación de cartílago limita la región donde se formarán los tendones y que, debido a que la expresión de *Sox9* precede a la de *Scx* probablemente era un requisito para la inducción de los tendones. Interesantemente, en el ratón nulo para *Sox5/6* se observó que en el tronco, la expresión de *Scx* se extiende ocupando las zonas donde normalmente se desarrolla cartílago (Brent *et al.*, 2005) sugiriendo

que los destinos condro y tenogénicos son destinos alternativos de las células precursoras comunes (**Fig. 11**).

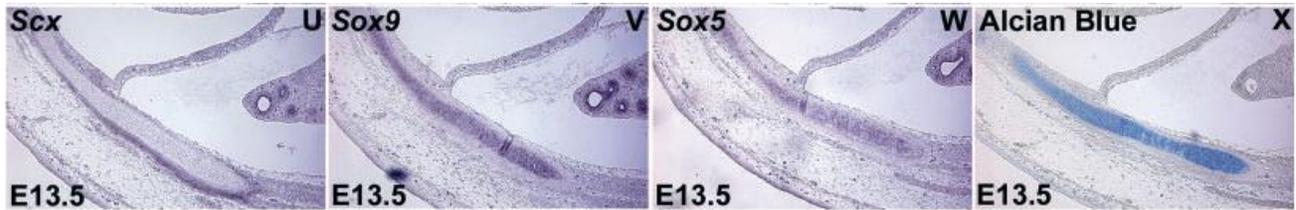


Figura 11. Comparación espacial y temporal de la especificación y diferenciación de los progenitores de tendones y cartilago. Cortes de costilla de embriones de rato en etapa E13.5 procesados por hibridación *in situ* para *Scx* (U), *Sox9* (V), and *Sox5* (W). (X) Tinción con azul Alciano. Tomado de: *Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development.* (Brent *et al.*, 2005).

Aunque en general *Sox9* y *Scx* se expresan en zonas mutuamente excluyentes, en las zonas donde se formarán articulaciones y tejido conjuntivo la expresión de *Sox9* se sobrepone con la de *Scx* (Asou *et al.*, 2002; Cserjesi *et al.*, 1995). Cabe destacar que en el mutante condicional *Sox9^{fl/fl};Prx1^{Cre}* donde la expresión de *Sox9* es eliminada del mesénquima de la extremidad, resulta en la falla temprana de las extremidades (Akiyama *et al.*, 2002). La expresión de *Scx* se pierde por completo en el autópodo para la etapa E13.5, sin embargo en las articulaciones del zeugópodo la expresión de *Scx* es similar al de los ratones silvestres y no se observa expresión en posiciones ectópicas, sugiriendo que el desarrollo de tendones es independiente de señales provenientes del esqueleto (Huang *et al.*, 2015).

Existe evidencia de que los tenocitos y los condrocitos derivan de células precursoras comunes, que pueden expresar simultáneamente *Scx* y *Sox9* (Sugimoto *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando inician el programa de diferenciación tenogénica, se vuelven tenocitos *Scx⁺* exclusivamente, mientras que las células que dan origen generan a los elementos esqueléticos se vuelven *Sox9⁺* (Blitz *et al.*, 2013; Sugimoto *et al.*, 2012) (**Fig. 12**).

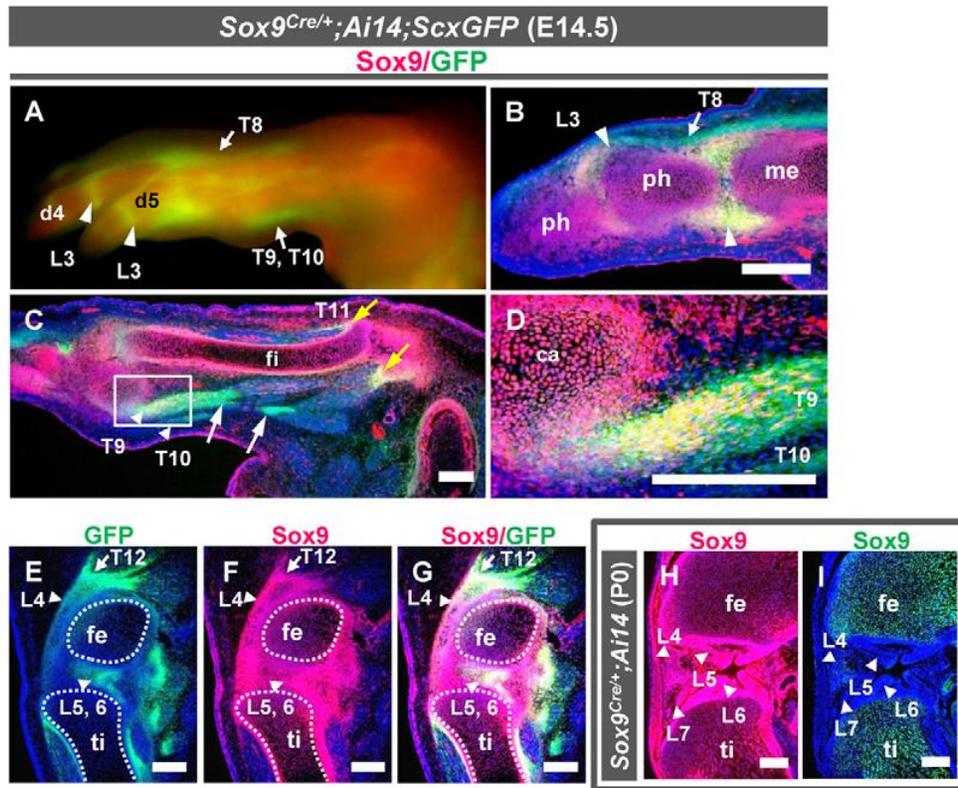


Figura 12. Contribución de linaje celular *Scx*⁺/*Sox9*⁺ a la formación de ligamentos y entesis. (A-D) La distribución de los tendones y ligamentos que expresan *Scx* (GFP, verde) con un historial de expresión de *Sox9* (tdTomato, rojo) se analizó en un embrión de ratón *Sox9*^{Cre/+};*Ai14*;*Scx*^{GFP} en etapa E14.5. Las flechas y puntas de flecha indican tendones y ligamentos, respectivamente. (A) Vista lateral de la extremidad posterior. (B-D) Secciones sagitales de extremidades posteriores. En B se muestra un dedo en desarrollo y las articulaciones presuntivas del dígito. Las flechas blancas y amarillas en C indican en la pantorrilla los tendones transmisión de fuerza y de anclaje, respectivamente. La región encuadrada en C se muestra con un aumento mayor en D. (E-I) Secciones sagitales de la articulación de la rodilla preparadas a partir de embriones *Sox9*^{Cre/+};*Ai14*;*Scx*^{GFP} en E14.5 (E-G) o de *Sox9*^{Cre/+};*Ai14* ratones recién nacidos (H,I). Los primordios cartilagosos en desarrollo del fémur y la tibia están enmarcados por la línea punteada. Las células *Scx*⁺ (E, G, verde) y las células *Sox9*⁺ (I, verde) se detectaron mediante inmunotinción con anticuerpos GFP y *Sox9*, respectivamente. Las células derivadas de los progenitores de *Sox9* + se detectaron mediante la expresión de tdTomato (F-H, rojo). Las puntas de flecha en E-I indican los ligamentos de la articulación de la rodilla. ca, calcáneo; d4, dígito 4; d5, dígito 5; fe, fémur; fi, peroné; yo, metacarpiano; ph, falange; ti, tibia. Barras de escala: 200 μ m. *Tomadp de: Scx*⁺/*Scx9*⁺ *progenitors contribute to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament.* (Sugimoto *et al.*, 2012).

Previo a la formación de los tendones y del cartílago en el mesénquima de las extremidades, TGF β 2 y Nogina se expresan de manera difusa en las células que se reclutan para formar los elementos esqueléticos y los tendones en desarrollo (Baffi *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 1999; Pryce *et al.*, 2009). Por otro lado, las BMP se expresan en las células que rodean el cartílago y en zonas que delimitan donde se desarrollarán los tendones (Merino *et al.*, 1998; Schweitzer *et al.*, 2001).

La sobre expresión de BMP en el cartílago en desarrollo induce el crecimiento dramático de los elementos esqueléticos, mientras que la sobreexpresión de sus antagonistas, como TGF β 2 y Nogina, los trunca (Merino *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 1999). En contraste, la expresión ectópica de BMP inhibe la expresión de *Scx*, y los tratamientos con TGF β y Nogina la inducen (Pryce *et al.*, 2009; Schweitzer *et al.*, 2001).

Particularmente, la disrupción de la señalización TGF β por delección de *TgfbR2* resulta en la pérdida de la mayoría de los tendones y de los ligamentos, sin embargo, la inducción de las células precursoras de los tendones no se afecta en estos mutantes, observándose alineadas entre los músculos en diferenciación y las condensaciones precondrogénicas sin embargo, la expresión de *Scx* se pierde poco después. La expresión transitoria de *Scx* sugiere que la inducción inicial es independiente de TGF β (Pryce *et al.*, 2009) (**Fig. 13**).

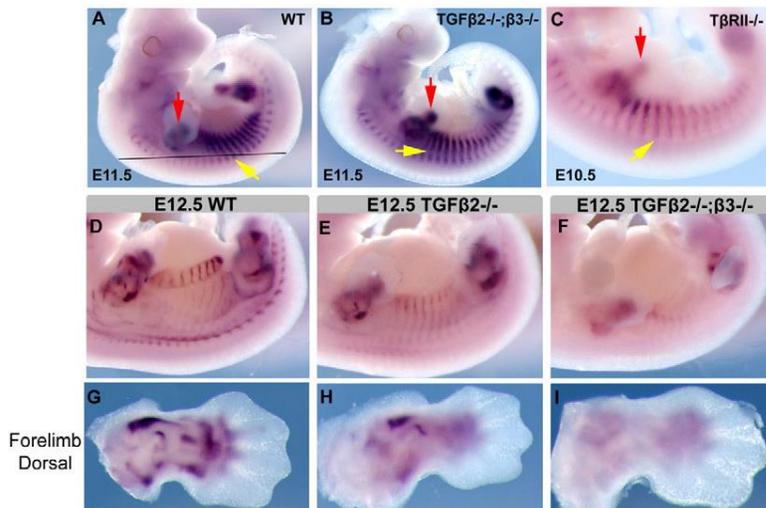


Figura 13. Fallo en el mantenimiento de las células progenitoras de los tendones en los mutantes de la vía de señalización TGFβ en etapa E12.5. (A-C) Hibridaciones *in situ* de embrión completo para Scx en etapa E11.5 silvestre (A), E11.5 *Tgfb2^{-/-}; Tgfb3^{-/-}* (B) y E10.5 *Tgfbr2^{-/-}* (C). Flechas amarillas, expresión de Scx en somitas; flechas rojas, expresión Scx en los primordios de las extremidades. La línea negra en A indica el nivel de una sección frontal a través del tronco. (D-L) Hibridaciones *in situ* de embrión completo para Scx en etapa E12.5 y las

vistas dorsal and ventral de las extremidades anteriores en embriones silvestres (D,G,J), *Tgfb2^{-/-}* (E,H,K) and *Tgfb2^{-/-};Tgfb3^{-/-}* (F,I,L). Tomado de: *Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFβ signaling are essential for tendon formation.* (Pryce *et al.*, 2009).

Papel del ectodermo en la inducción y la diferenciación de los tendones

La importancia del ectodermo sobre la especificación del patrón musculo-tendón-cartilago fue demostrada con extremidades recombinantes, los experimentos consistieron en la obtención de los primordios de las extremidades, que en etapas tempranas del desarrollo están compuestas por células mesenquimales indiferenciadas rodeadas de ectodermo. Para los experimentos, las células mesenquimales se dissociaban del ectodermo y se transferían al ectodermo de otra extremidad, esta recombinación de elementos se injertaba a la zona dorsal de otro embrión y se incubaba por 24 horas. Tiempo suficiente para observar el desarrollo de huesos, tendones, articulaciones, así como la correcta inserción de los músculos (MacCabe *et al.*, 1974). Muchos otros experimentos de esta naturaleza demostraron que en el ectodermo existe la información que se requiere para la formación y distribución de los elementos que conforman las extremidades.

Del mesénquima que está inmediatamente por debajo del ectodermo, surgen diferentes tipos de tejido conjuntivo incluyendo los tendones, el tejido conjuntivo que recubre a los músculos y la dermis (Pearse *et al.*, 2007; Thorogood and Hinchliffe, 1975).

Particularmente, la relación espacial entre los precursores de los tendones y el ectodermo es muy estrecha. Los primordios proximales se extienden desde la membrana basal del ectodermo en dirección hacia el esqueleto subyacente. En contraste, los primordios intermedios permanecen subyacentes al ectodermo y se extienden en dirección al cartílago hasta etapas tardías (Huang *et al.*, 2015; Kardon, 1998). El tercer par, que corresponde a los tendones de la región distal aparecen ventral y dorsal a las zonas de unión entre el metatarso y las falanges.

La contribución del ectodermo al establecimiento de los tendones se ha demostrado al remover el ectodermo, donde se pierde la expresión de marcadores de tendones como *Tenacina* y *Scx* (Kardon, 1998; Schweitzer *et al.*, 2001; Solursh *et al.*, 1981; Tozer and Duprez, 2005; Yamamoto-Shiraishi and Kuroiwa, 2013).

Durante el desarrollo normal, el primordio proximal define la región que separa al muslo de la pantorrilla y en etapas subsecuentes, los tendones se insertan en los músculos del muslo y en el origen de los tendones de la pantorrilla. Al remover el ectodermo de la región del primordio intermedio los músculos extienden su dominio hasta la región distal de la rodilla (Kardon, 1998) (**Fig. 14**).

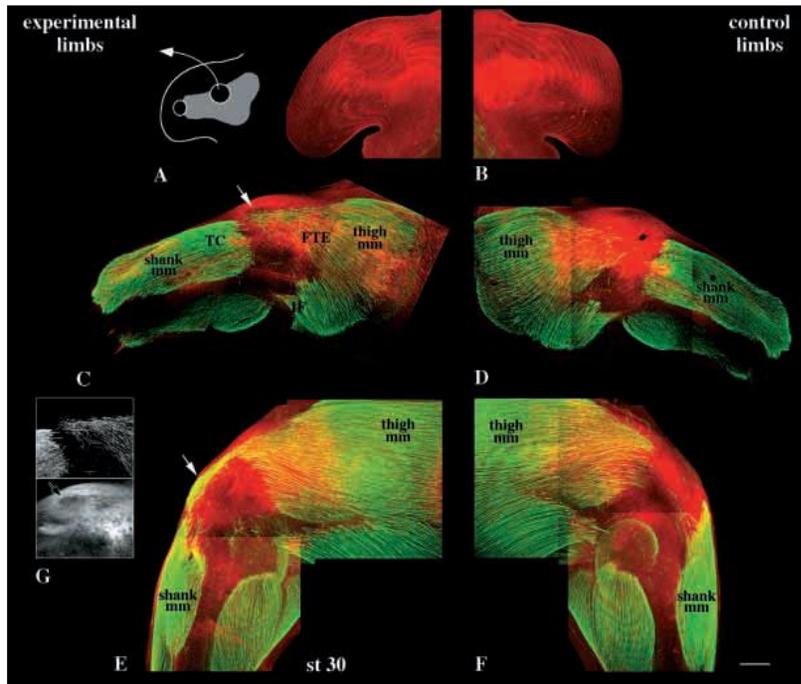


Figura 14. Vista dorsal del desarrollo muscular en extremidades al remover el primordio del tendón proximal dorsal. (A-F) Reconstrucción de secciones ópticas a través de extremidades marcadas con anticuerpo HB1 para Tenascina (TNC) en rojo y F59 para MHC rápido en verde. A, C y E son extremidades experimentales; B, D y F son sus extremidades contralaterales control. (A-B). Extremidades en el momento de la cirugía. Se esquematiza la extracción del primordio del tendón proximal (los círculos representan los primordios de los tendones, los precursores miogénicos en gris) y en la extremidad experimental (A) en comparación con la extremidad de control

(B). (C-D) Dos días después de la cirugía, el músculo ectópico (flecha) se distingue entre las masas musculares del muslo y las de la pierna, cubriendo a la rodilla. Este músculo ectópico parece ser una extensión distal al músculo FTE. Nótese que los tendones, como el tendón distal del músculo IF, derivados del primordio proximal dorsal reaparecen, ya sea porque el primordio del tendón no se eliminó por completo o debido a la regulación posterior por parte de la extremidad en desarrollo. (E-F) El músculo ectópico (flecha) entre las masas musculares del muslo y la pantorrilla persiste 3 días después de la cirugía. (G) Comparación de los niveles de TNC y músculo ectópico en la extremidad experimental que se muestra en C. El panel superior muestra la tinción F59 y la tinción HB1 del panel inferior. El músculo ectópico aparece en una región de tinción de TNC baja. Barra de escala, 250 mm (para todas las imágenes). Tomado de: *Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb*. (Kardon, 1998).

La influencia del ectodermo sobre la diferenciación de los tejidos conjuntivos se ha atribuido a la señalización de los miembros de la familia WNT. La señalización WNT/ β -catenina coordina el destino celular de la formación del tejido conjuntivo, manteniendo las células mesenquimales sub-ectodérmicas como un nicho de células progenitoras (ten Berge *et al.*, 2008). Interesantemente, la remoción del ectodermo dorsal en etapas tempranas del desarrollo de las extremidades regula a la baja la expresión de *Scx* (Schweitzer *et al.*, 2001). En su lugar, la expresión ectópica de *Sox9* sustituye los sitios donde normalmente se expresa *Scx*. En contraste, la sobreexpresión de *Wnt6* en el mesénquima de la extremidad, inhibe el

proceso de maduración de la condrogénesis (Geetha-Loganathan *et al.*, 2010). Aunque la regulación de *Scx* no fue evaluada, es probable que su expresión también pudo haber sido inhibida bajo estas condiciones.

Aunado a esto, la sobreexpresión de *Sox9* en los tenocitos promueve su conversión a condrocitos (Akiyama *et al.*, 2005; Soeda *et al.*, 2010; Takimoto *et al.*, 2012). Por lo tanto, el programa de diferenciación tenogénica puede ser redirigido hacia otro destino celular. La dualidad de estos destinos celulares se evidencia en que TGF β induce rápidamente *Scx* y *Sox9* en cultivos de micromasas de mesénquima extraído de interdígito. La evidencia apunta a que la expresión de las proteínas de unión a los activadores transcripcionales SMAD2/3, *Tgif1* o *SnoN*, ambas conocidas como represoras de la señalización TGF β , van a favorecer la iniciación de la condrogénesis o de la tenogénesis, respectivamente (Lorda-Diez, Montero, *et al.*, 2009).

Para el presente estudio se utilizó el modelo *in ovo*, el cual permite disminuir el uso de modelos murinos, además, este modelo ha proporcionado un mejor entendimiento de los mecanismos de diferenciación celular en humanos (Davey and Tickle, 2007).

Planteamiento del Problema

La coordinación de la diferenciación celular del sistema músculo-esquelético está altamente regulada durante el desarrollo de las extremidades. La señalización WNT/ β -catenina, que proviene del ectodermo, es una señal que por sí misma inhibe la diferenciación celular. Sin embargo, el efecto de WNT/ β -catenina puede ser modificado dependiendo del contexto y/o la combinación con otros factores de crecimiento y diferenciación.

En la región más distal de la extremidad, la señalización de las vías WNT y FGF mantienen las células mesenquimales en un estado indiferenciado. A medida que los precursores mesenquimales se alejan, entran en contacto con otros factores de diferenciación e inician un programa de diferenciación, manteniendo los progenitores de los tendones.

Aunque es claro que TGF β puede estimular la expresión de Scx y el reclutamiento de precursores de los tendones, la inducción inicial que desencadena la expresión de Scx, ocurre de manera independiente de TGF β . Por lo tanto, el inicio del programa tenogénico podría ser determinado por la regulación de la vía WNT/ β -catenina.

Hipótesis

La influencia inhibitoria de la vía de señalización WNT/ β -catenina, que se libera del ectodermo dorsal y ventral, es modificada por la presencia de la vía TGF β al inicio del programa de diferenciación de los tendones determinada por la expresión de Scx.

Objetivo

Determinar el papel de señalización WNT/ β -catenina en la inducción de la transcripción de *Scleraxis* en los precursores de los tendones de las extremidades embrionarias de pollo.

Materiales y métodos

Animales

En todos los tratamientos se utilizaron huevos fértiles ALPES II (Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A., Puebla, México) de gallinas Leghorn. Los embriones se incubaron a $\approx 38^{\circ}\text{C}$ durante 6.5 días para ser tratados en etapa 28HH (Hamburger and Hamilton, 1951).

Proteínas y fármacos

Los tratamientos consistieron en la colocación de perlas de heparina (Cat. H5263 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) embebidas en las proteínas WNT3A, o DKK1 (Cat. 315-20, 120-30 Preprotech, CDMX, México), en una concentración de 1mg/ml. WNT3A es un ligando que activa eficientemente la señalización WNT/ β -catenina, mientras que DKK1 es un antagonista de la señalización WNT debido a la alta afinidad para unirse al co-receptor LRP-6, impidiendo la activación de la vía (Clevers and Nusse, 2012).

Se utilizaron perlas de agarosa azul affigel (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) embebidas en TGF β 1 (Cat. 100-21 Preprotech) en una concentración de 200 ng/ml; y perlas de acetato AG1-X2 (Cat. 1401231 BioRad Laboratories Inc.) para y los fármacos de molécula pequeña SB431542 y SIS3 (Cat. 616461, 566405 Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), en concentraciones de 50mM y 20mM, respectivamente. SB431542, es un inhibidor selectivo para los receptores de tipo Activinas (ALK), a través de los que TGF β activa su vía de señalización (Gareth J. Inman *et al.*, 2002; Massagué, 1998). SIS3 tiene una alta afinidad por SMAD3, lo que impide su dimerización con SMAD2 evitando su función de activador transcripcional (Jinnin *et al.*, 2006). Para analizar a mayor profundidad la actividad de WNT/ β -

catenina usamos BIO (GSK-3 Inhibitor IX, CAS 667463-62-9, Cat. 361550, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un inhibidor del complejo de degradación de β -catenina y el fármaco llamado Agonista de Wnt (CAS 853220-52-7, Cat. 681665, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todas las perlas se lavaron en PBS previo a la colocación de los factores mencionados y, se incubaron en hielo con los factores antes mencionados por lo menos 1 hora antes de su implantación en las extremidades.

Experimentación *in ovo*

Para acceder al embrión dentro del huevo, se abrió una ventana en de la cámara superior de aire, con pinzas de relojero se retiró la membrana coriónica y posteriormente, se abrió la membrana amniótica. Con ayuda de un asa y un punzón de aguja de tungsteno, se abordaron las extremidades posteriores derechas para exponer la parte dorsal del autópodo. Las perlas se colocaron en un área tenogénica presuntiva limitada por el borde distal del tendón Extensor Digitorium Communis (Huang *et al.*, 2015). Para todos los experimentos, se usó la extremidad derecha y como control, se dejaron las extremidades posteriores izquierdas sin tratar. Después de colocar las perlas, los embriones de pollo se regresaron a la incubadora y se mantuvieron hasta el momento de su recolección (30 minutos, 1, 2, 4, 8 y 16 horas). Las extremidades se recolectaron en PBS frío, se fijaron en PFA 4%, se deshidrataron en gradiente de metanol y se almacenaron para su posterior análisis mediante hibridación *in situ*.

Todos los experimentos se hicieron por triplicado, las n se muestran para cada tratamiento sencillo reflejan las de los experimentos para los que fueron dirigidos específicamente. En los tratamientos simultáneos, se realizaron controles positivos con cada fármaco o proteína

que no se reflejan en las n de los tratamientos sencillos. Sin embargo, para tomar el experimento de tratamientos simultáneos como positivo, en los controles se veía el efecto en al menos 4/5 extremidades.

Ribosondas de cDNA

Se realizó hibridación *in situ* para la identificación de *Scx*, *Axina2*, *N-myc* y *Wnt9a*. La sonda de *Scx*, fue donada por el Dr. Cliff Tabin (Universidad de Harvard). Para comprobar la regulación de la señalización WNT/ β -catenina se generaron sondas mediante RT-PCR para los genes blanco *Axina2* y *N-Myc*. Para amplificar un fragmento de 403 pb de *Axina2*, con base al número de acceso NM_204491.1 se diseñaron los primers: Forward-TCGAGAACAACAGCATCGTC, Reverse-GACCTGTACCCGTTCTC-CAA. Para la amplificar un fragmento de 481pb de *N-Myc*, se diseñaron los primers con base al número de acceso NM_001030952.1: Forward- AGC GAC TCG GAA GAA GAA CA, Reverse-CGT CCG ATT GGA TAG ACA GAA. Como templado se usó ARN total previamente obtenido de extremidades embrionarias de pollo en etapa 28HH. El cDNA de cadena sencilla se sintetizó con el kit *ipsogen* de transcriptasa reversa libre de RNasaH (Cat. 679923 Invitrogen, California, USA). Para clonar los fragmentos se usó el vector P-GEM T-easy (Cat. PR-A1360 Promega, Madison, USA). Las clonas se obtuvieron con células competentes MAX efficiency DH5 α TM (Cat. 18258012 Invitrogen). Para las hibridaciones *in situ*, las sondas de ARN se marcaron con una cola de UTP-digoxigenina (Cat. 3359247910 Roche, Basilea, Suiza) como se ha descrito previamente (Merino *et al.*, 1998).

Hibridación *in situ*.

Las muestras se rehidrataron en gradientes de metanol. Para aclarar y permeabilizar los tejidos, las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno al 6% 1 hora y posteriormente con 28 µg/mL de proteinasa K (pK) durante 28 minutos en un baño húmedo a 20°C. El bloqueo para el anti-DIG-AP (cat. 11207733910 Roche, Switzerland) se realizó con suero bovino al 10%. Todas las soluciones se realizaron en PBS Tween al 1%. Las muestras se tiñeron con BM Purple AP (cat. 11442074001 Roche, Switzerland) y fijadas en paraformaldehído al 4%.

Cortes en vibratomo

Después de la hibridación *in situ* las muestras se embebieron en agarosa-PBS al 4%. Se obtuvieron cortes histológicos de 40µm en un microtomo de cuchilla vibrante Leica VT1000S (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

Captura de imágenes

Las imágenes de las hibridaciones *in situ* de las extremidades completas y de los cortes obtenidos fueron capturados en un microscopio SMZ1500 (Nikon, Tokyo Japan) usando el software Axiovision® (Zeiss, Oberkochen, Germany).

RESULTADOS

A lo largo del desarrollo de las extremidades, la expresión de WNT3A en el ectodermo regulan el mantenimiento del estado indiferenciado del mesénquima, inhibe la diferenciación del cartílago y se ha propuesto que dependiendo del tiempo de exposición y etapa del desarrollo, la vía de señalización WNT/ β -catenina promueve la diferenciación de las células mesenquimales a tejido conectivo (ten Berge *et al.*, 2008; Geetha-Loganathan *et al.*, 2010; Kardon *et al.*, 2003; Wolpert, 1998). En contraste, en células derivadas de los tendones de Aquiles de ratas se observó que WNT3A inhibe la expresión génica de *Scx* (Kishimoto *et al.*, 2017). Para esclarecer si la vía de señalización WNT/ β -catenina también es importante para la regulación de la expresión de *Scx* en las células precursoras de tendones, decidimos evaluar la habilidad de WNT3A para regular la expresión de *Scx in vivo*.

Para estos experimentos se usaron perlas embebidas en WNT3A que se colocaron en la zona tenogénica presuntiva, delimitada por el extremo distal del blastema del tendón EDC y la tercera falange proximal. Los resultados mostraron que WNT3A inhibió la expresión de *Scx* en los tratamientos por 4 horas (7/8), en comparación con la extremidad contralateral (Fig. 15a, b). Estos datos muestran que la señalización de WNT/ β -catenina regula la expresión génica de *Scx in vivo*.

Para determinar la participación de WNT endógena en la expresión *in vivo* de *Scx*, colocamos perlas embebidas en DKK1, el antagonista del receptor de la vía canónica de WNT. Aquí se mostró que se promueve la expresión de *Scx*, claramente visible en la cuarta hora de tratamiento (8/8) (Fig. 15a, c); sin embargo, en tratamientos de seguimiento más prolongado, después de 8 horas el patrón de *Scx* era similar al control.

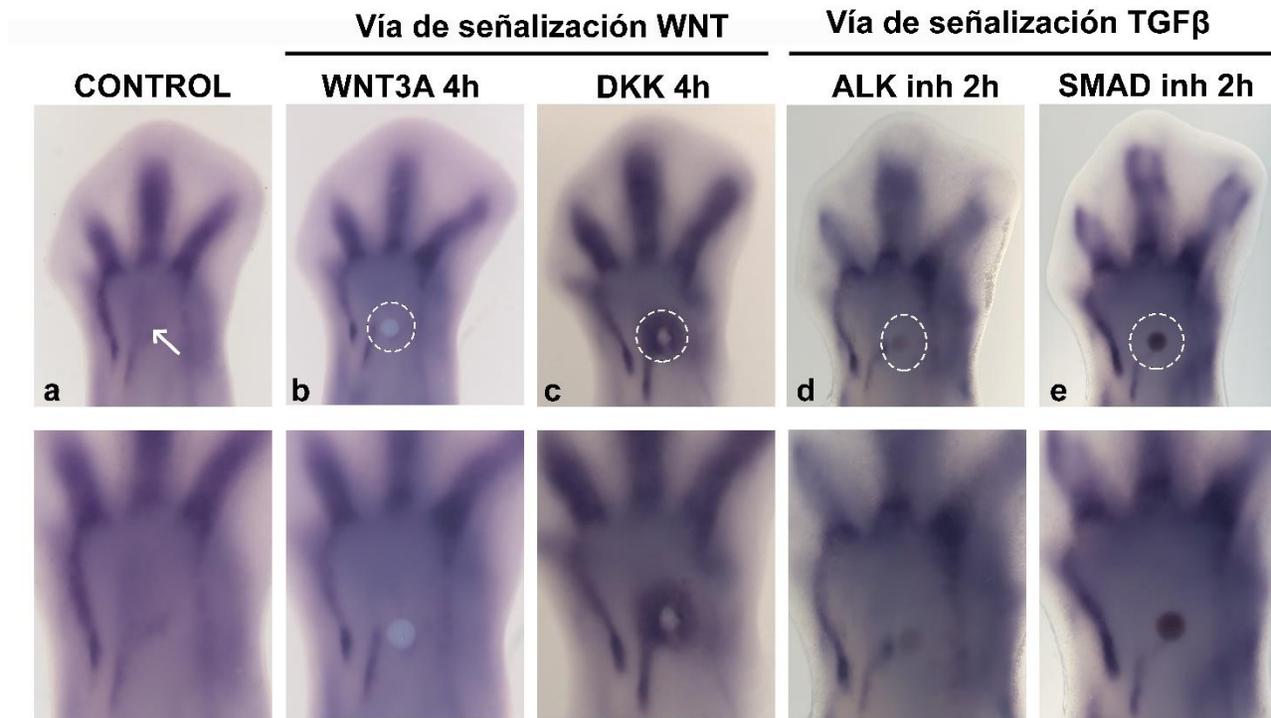


Figura 15. La señalización canónica de WNT y TGF β endógeno regulan la expresión de Scx. Hibridaciones *in situ* en extremidades embrionarias de pollo en etapa 28HH. Efecto sobre la expresión de Scx después de 4 horas de los tratamientos con WNT3A, DKK, inhibidor de ALK o el inhibidor de SMAD. a) La flecha blanca señala el blastema del tendón EDC en la extremidad control. b) Inhibición de Scx por los tratamientos con WNT3A (7/8) mientras que, c) DKK induce la expresión de Scx (8/8). La inhibición de la señalización endógena de TGF β d) por inhibición de la fosforilación del receptor ALK (8/8) o e) de la activación transcripcional de SMAD (5/6) resultó en la inhibición de la expresión de Scx. Las líneas punteadas delimitan el área de inhibición (WNT3A, ALK inhib y SMAD inhib) o de inducción (DKK) de la expresión de Scx, tomando como referencia del centro de la perla al límite del efecto. ABAJO: Acercamientos de las extremidades donde se aprecian la expresión normal y los tratamientos.

Por lo tanto, la inducción inicial de la expresión de Scx en las células precursoras de los tendones que se encuentran cercanas al ectodermo requieren de un mecanismo antagónico de la vía de señalización WNT/ β -catenina para entrar al programa de diferenciación tenogénica.

La señalización de TGF β es fundamental para la expresión y mantenimiento de los tenocitos, además induce la transcripción de Scx, que en ratones se detecta en los tenocitos desde

etapas tempranas del desarrollo y hasta etapas adultas (Pryce *et al.*, 2009; Seo and Serra, 2007). En este trabajo decidimos comprobar la dependencia de TGF β endógena para la expresión de *Scx* *in vivo*. Para esto, usamos el inhibidor del receptor tipo I ó de Activinas tipos 5,4,7, por sus siglas en inglés ALK5, ALK 4 y ALK7 (ALK inhib) (8/8) y el inhibidor del activador transcripcional SMAD2/3 (SMAD inhib) (8/9) (Fig. 15g, h). Los resultados mostraron que ambos tratamientos rápidamente inhiben la expresión de *Scx*, lo que comprobó en nuestro modelo *in vivo*, que TGF β regula directamente la activación del gen *Scx*, adicionalmente que lo hace través de la activación transcripcional mediada por SMAD2/3.

La rápida respuesta observada con los tratamientos de las vías WNT y TGF β , nos llevaron a especular sobre el efecto antagónico de ambas señales para inducir tendones. Teniendo en cuenta que DKK1 se expresa en el mesénquima dorsal en la zona tenogénica presuntiva y se ha implicado en la regulación de la expresión de marcadores tendones y en la formación del cartílago a través de WNT y BMPs (Grotewold and Rüther, 2002) decidimos evaluar el efecto su papel en la inducción de los tendones, para ello realizamos tratamientos simultáneos de DKK, y los inhibidores de TGF β . Los resultados mostraron que tanto la inhibición de la señalización WNT/ β -catenina como la inducción de la vía de TGF β mostraron ser capaces de promover la expresión de *Scx* (Fig. 16b-e). Indicando que ambos factores son necesarios para inducir la diferenciación tenogénica.

Se ha propuesto la existencia de un factor de diferenciación distinto al que induce el programa tenogénico en etapas tempranas, previo a la señalización de TGF β (Pryce *et al.*, 2009), por este motivo nos preguntamos si la inhibición de la vía de señalización WNT/ β -catenina, observada con el tratamiento sencillo de DKK podría ser un factor suficiente y necesario para promover la expresión de *Scx* y potencialmente la formación de tendones,

por lo que realizamos experimentos para bloquear simultáneamente las dos vías de señalización y evaluar si la expresión de *Scx* podría inducirse aún en la ausencia de TGF β . Interesantemente, observamos la inducción de *Scx* por DKK aún en presencia del inhibidor de ALK (6/8) y del inhibidor de SMAD2/3, SIS3 (6/8) (Fig. 16b, c).

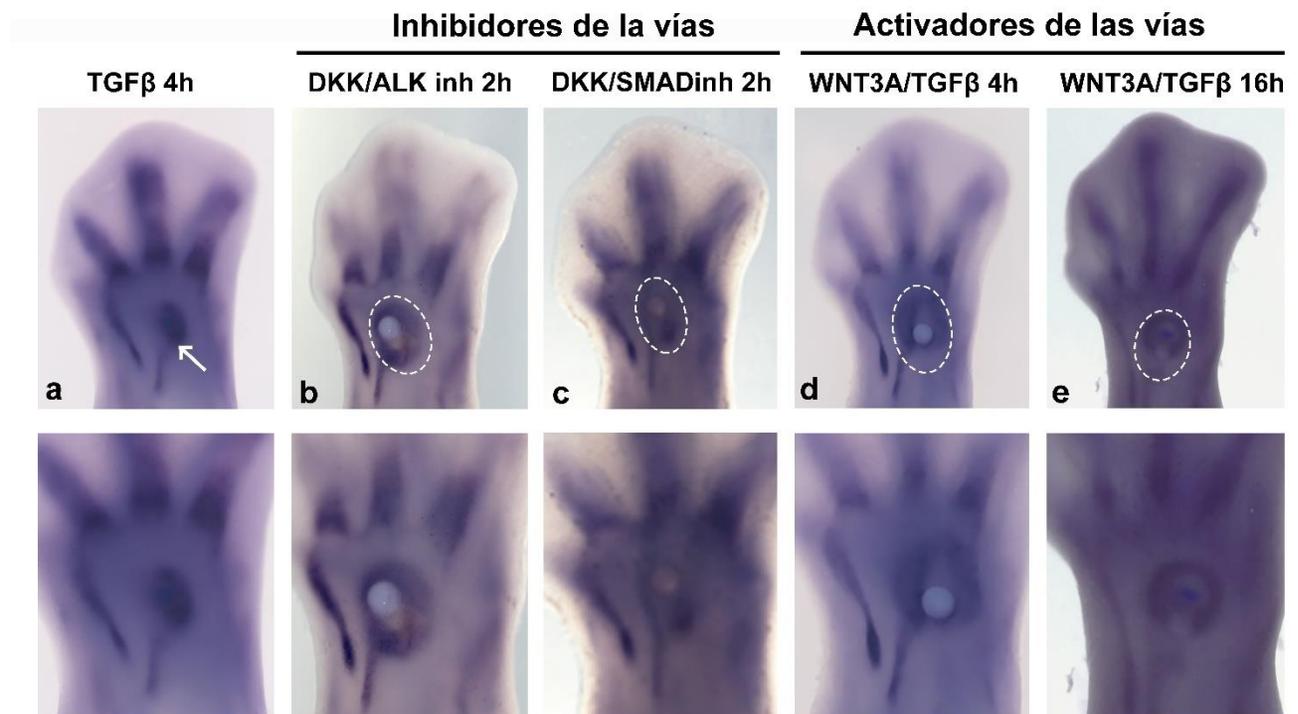


Figura 16. La inhibición de WNT/ β -catenina es necesaria y suficiente para inducir la expresión de *Scx*. Hibridaciones *in situ* para *Scx* en extremidades embrionarias de pollo en etapa 28HH después tratamientos con TGF β , la combinación de DKK y los inhibidores de TGF β y la combinación de WNT3A y TGF β . a) Inducción de *Scx* a las 4 horas de tratamiento con TGF β (8/9). Tratamientos simultáneos de DKK con b) inhibidor de ALK (6/8) o c) inhibidor de SMAD (6/8) a las 2 horas. Tratamientos simultáneos con TGF β y WNT3A a las d) 4 horas (11/11) y e) 16 (7/8) horas. Los tratamientos simultáneos de DKK inducen la expresión de *Scx*, aun bloqueando la señalización TGF β . La flecha blanca indica la inducción de *Scx* con el tratamiento de TGF β . Los círculos delimitan el área de inhibición (WNT3A, ALK inh y SMAD inh) y de inducción (DKK y TGF β) de la expresión de *Scx*, tomando como referencia del centro de las perlas al límite del/los efectos. ABAJO: Acercamientos de las extremidades donde se aprecian la expresión normal y los tratamientos.

Tomando en cuenta lo anterior, y que la expresión de *Scx* puede ser particularmente inducida con el tratamiento sencillo de DKK (Fig. 15c), planteamos que *in vivo* la inhibición de WNT/ β -catenina es suficiente y necesaria para inducir la diferenciación tenogénica mediante la activación de la expresión de *Scx*. En contraste, debido a que *Scx* puede ser inducido aun en ausencia del receptor T β RII (Pryce *et al.*, 2009), proponemos que la vía de señalización TGF β es necesaria pero no suficiente para inducir la expresión de *Scx*.

La exposición prolongada del mesénquima a WNT puede inhibir la expresión de *Scx* (Kishimoto *et al.*, 2016; Kishimoto *et al.*, 2017), debido a esto se realizaron tratamientos simultáneos con WNT3A y TGF β 1 para establecer si la activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina podría tener una mayor jerarquía sobre TGF β para promover la expresión de *Scx* en las células mesenquimales de la zona presuntiva de los tendones. Los resultados mostraron que aún en presencia de WNT3A, TGF β indujo la expresión de *Scx* notablemente observado desde la cuarta hora de tratamiento (11/11) y mantenido hasta 16 horas de tratamiento (7/8) (Fig. 16d, e). Una posible interpretación de estos resultados es que, en estas células, TGF β es necesario para promover la expresión de las proteínas que controlan la vía de señalización WNT/ β -catenina.

Para analizar la activación de los genes blanco, característicos de la vía Canónica de WNT y su posible regulación por TGF β analizamos la expresión de *Axina2* y *N-Myc* y *Wnt9a* en las extremidades embrionarias de pollo en etapas 27HH a 31HH.

La expresión de *Axina2* se expresa claramente en los interdígitos, en las zonas donde se desarrollan articulaciones y también coincide con zonas donde aparecen los blastemas de los tendones EDC, en contraste se excluye de los elementos esqueléticos (Fig. 17a-c). En

general, el patrón más dinámico se observó en la zona distal, conforme los dedos crecen, el patrón alternado dedo-interdígito se hace evidente y *Axina2* se mantiene a lo largo de los interdígitos a excepción de la zona más distal (Fig. 17a).

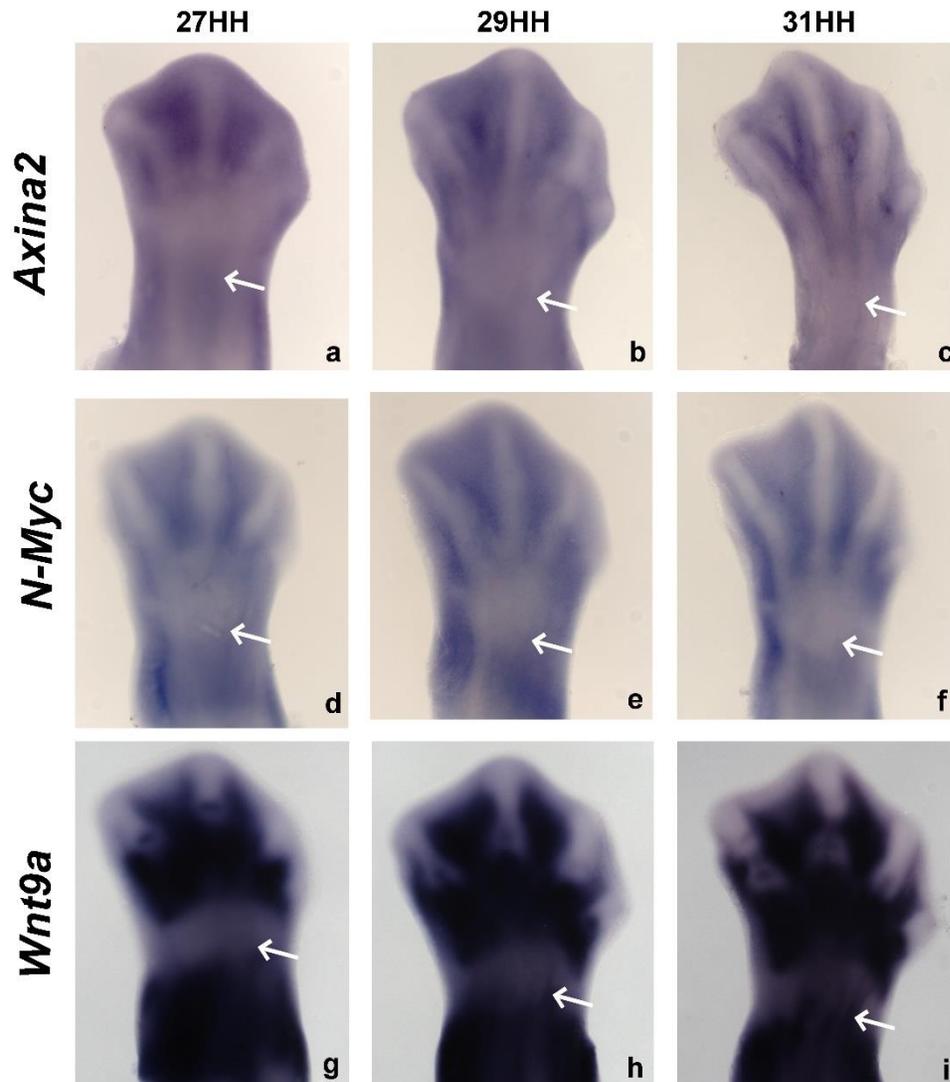


Figura 17. Patrón de expresión de genes blanco de la señalización WNT/ β -catenina en la zona tenogénica presuntiva 27HH a 31HH. a-c) *Axina2* se expresa en el interdígitos, en las zonas donde se desarrollan articulaciones, en la zona tenogénica presuntiva y se excluye de los elementos esqueléticos. a) En 27HH, se observó una banda de *Axina2* en la base de los dedos y a lo largo de los interdígitos. b) En etapa 29HH, la expresión de *Axina2* se empieza a restringir y desaparece de las zonas donde ocurre muerte celular. c) En 31HH la expresión más intensa se observó en el pericondrio que rodea los elementos esqueléticos y en las inserciones de los tendones en los elementos esqueléticos. Las flechas indican la zona tenogénica presuntiva en todos los casos

Posteriormente, en etapa 29HH la expresión de *Axina2* se empieza a restringir siendo excluido de las zonas donde ocurre muerte celular (Fig. 17b) (Chimal-Monroy *et al.*, 2011), hasta que en 31HH la expresión más intensa se restringe al pericondrio que rodea los elementos esqueléticos (Fig. 17c). De manera particular encontramos que en la zona tenogénica presuntiva, *Axina2* mantuvo una expresión ligera que, aparentemente se modifica por el desarrollo de los elementos esqueléticos y articulaciones subyacentes (Fig. 17a-c).

Por otro lado, el gen *N-Myc* ha mostrado tener un papel en la dualidad del destino celular de los precursores mesenquimales que residen en las extremidades en desarrollo (ten Berge *et al.*, 2008). En las extremidades embrionarias de pollo, observamos su expresión en zonas que excluyen los elementos esqueléticos, observamos que *N-Myc* se expresa de manera tenue en los interdígitos (Ros *et al.*, 1995), y en la unión del zeugópodo y el autópod, de donde surge el blastema del EDC (Fig. 17d). Conforme avanza el desarrollo, la expresión de *N-Myc* se limita al pericondrio y, en la zona tenogénica presuntiva se concentra en las zonas de inserción en la base de los dedos (Fig. 17e, f).

Y finalmente, *WNT9A*, un ligando que activa la vía canónica de WNT. Este gen se ha implicado en la formación de articulaciones especialmente en la formación de la inserción de los tendones en los metatarsos en el pie y los carpos de la muñeca en ratón (Guo *et al.*, 2004; Später *et al.*, 2006). Sin embargo, el patrón de expresión obtenido en nuestro laboratorio fue distintivo. Característicamente, la expresión de *Wnt9a* abarcó las masas musculares del zeugópodo y también fuertemente expresado en los interdígitos en etapa 27HH (Fig. 17g). Conforme avanza el desarrollo, en la etapa 29HH la expresión se observa en las inserciones en la base de los dedos y en las zonas donde se formarán las articulaciones de las falanges

(Fig. 17h), después en la etapa 31HH se observa que se expresa en las uniones miotendinosas del EDC (Fig. 17i).

Para analizar la posible regulación de la vía de señalización WNT/ β -catenina en la zona tenogénica presuntiva realizamos cortes sagitales de extremidad en la etapa 28HH, y revisamos a detalle la expresión de *Axina2*, *N-Myc* y *Wnt9a*. En los cortes de las hibridaciones *in situ* de *Axina2* se observa la expresión en las células mesenquimales adyacentes al ectodermo, a distancia de los elementos esqueléticos, la expresión es más tenue en la zona presuntiva de los tendones, mientras que, sobre la zona de la base de los dedos, la señal fue más intensa (Fig. 18a). Decidimos evaluar los efectos de los tratamientos de 4 horas con TGF β y WNT3A sobre la expresión de *Axina2*. Los resultados mostraron que TGF β incrementa la expresión de *Axina2* en el área cercana al ectodermo paralela a la zona donde se desarrolla el tendón EDC (8/10) (Fig. 18b). Como control, observamos la capacidad de WNT3A para promover la expresión de *Axina2*, que se extendió en todo el espesor del mesénquima (5/7), desde las células que se encuentran directamente por debajo del ectodermo hasta las que se encuentran cercanas a los elementos esqueléticos (Fig. 18a, c). Adicionalmente, evaluamos la expresión *N-Myc*, que en ratones se expresa todo el espesor del mesénquima dorsal de la extremidad y se excluye de las células que se diferencian hacia cartílago (ten Berge *et al.*, 2008; Ota *et al.*, 2007), en nuestros cortes pudimos observar el mismo patrón de expresión de *N-Myc* que se expresaba en las células mesenquimales desde el ectodermo hasta el límite del cartílago. Con el tratamiento de TGF β se promovió ligeramente la expresión de *N-Myc* en la región cercana al ectodermo (9/9) (Fig. 18d, e) mientras que WNT3A, promueve su expresión intensamente en la misma zona, donde se formarán los tendones (Fig. 18f).

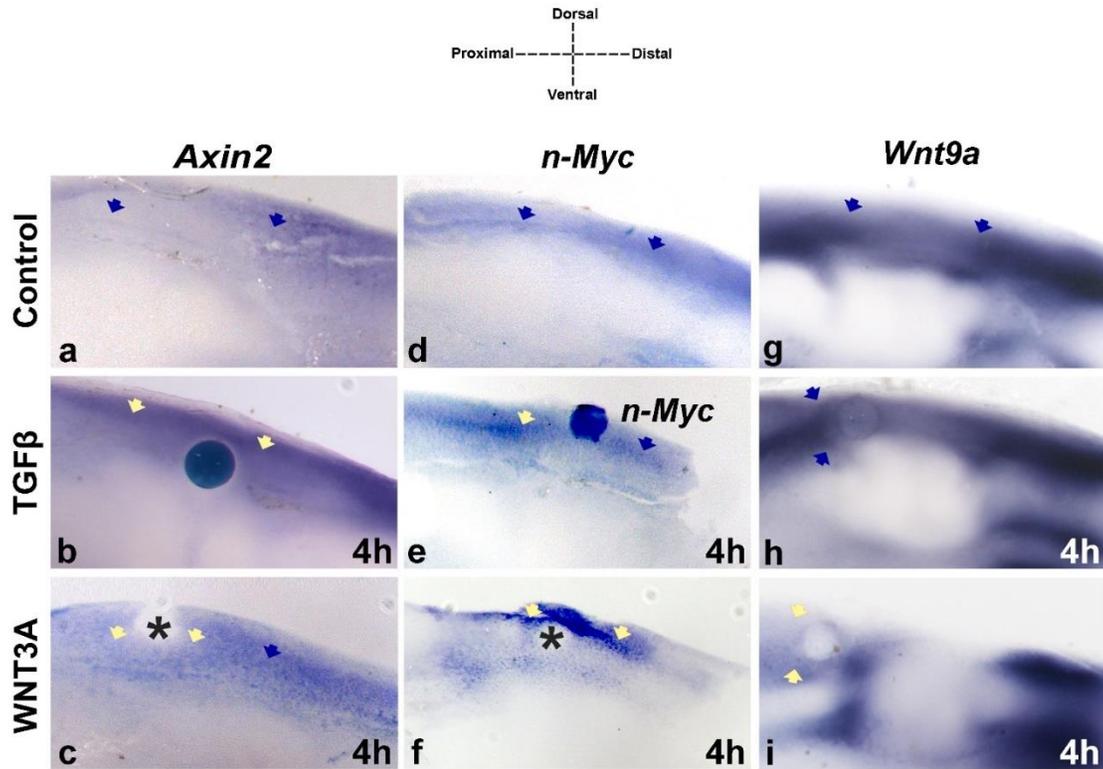


Figura 18. Regulación de los genes blanco de la señalización WNT/ β -catenina por TGF β y WNT3A. Hibridaciones *in situ* de *Axina2*, *N-Myc* y *Wnt9a* en etapa 28HH en extremidades control y con los tratamientos. Los cortes sagitales se realizaron después de las hibridaciones *in situ* para analizar la región tenogénica presuntiva del EDC. La expresión de los genes blanco de la señalización WNT se observaron en las células mesenquimales en contacto con el ectodermo y en el caso de *Wnt9a* en las masas musculares y en los sitios de inserción de los tendones en el hueso. Los cambios en el área de expresión se indican con las flechas beige, mientras que la expresión basal se indica con las flechas azules, después del tratamiento con TGF β o WNT3A en comparación con los controles. El asterisco destaca la posición de las perlas en c) y f).

Por último, analizamos la expresión de *Wnt9a* que en los cortes histológicos se observó que se expresa en las células mesenquimales subectodérmicas donde se forman los blastemas de los tendones, en las masas musculares y en los sitios de inserción a los elementos esqueléticos (Fig. 18g). Con el tratamiento con TGF β observamos que la señal que corresponde a las masas musculares se extendía rodeando la perla (6/6) (Fig. 18h). Interesantemente, el tratamiento con WNT3A inhibió la expresión de *Wnt9a* (4/5) (Fig. 4i).

Consistente con lo encontrado previamente, ambas cascadas de señalización regulan la diferenciación de los músculos (Zhang *et al.*, 2018).

Debido a que estos tres genes se expresan en la zona tenogénica presuntiva y que, tuvieron una alta respuesta con ambos tratamientos, nos surgió la hipótesis de que las señales provenientes del ectodermo se difunden formando un gradiente en dirección hacia los elementos esqueléticos. Por lo tanto, la capacidad de las células mesenquimales para entrar al programa de diferenciación tenogénica depende de la competitividad entre las vías de señalización WNT y TGF β para promover la expresión de Scx en las células mesenquimales que están cercanas al ectodermo, pero a distancia de los elementos esqueléticos.

Para analizar la capacidad de respuesta de las células mesenquimales a los diferentes tratamientos evaluamos la expresión de Scx en cortes sagitales. Los resultados mostraron que TGF β promovió la expresión de Scx únicamente en las células mesenquimales cercanas al ectodermo (8/9), paralelas a la señal endógena, sólo los casos donde la perla se encontraba cerca del ectodermo indujeron la expresión de Scx (Fig. 19a, b).

La inhibición de la señalización WNT/ β -catenina mediante los tratamientos con DKK indujeron la expresión de Scx principalmente en una región cercana al ectodermo, en contraste con la inducción con TGF β , DKK indujo Scx también en zonas más cercanas al esqueleto (8/8), encontrando que el tratamiento podría inducir Scx aunque estuviera alejado del ectodermo. (Fig. 19a, c). En concordancia con lo antes visto, WNT3 inhibió la expresión de Scx cuando las perlas eran colocadas cercanas al EDC, no afectando otras estructuras a distancia (7/8) (Fig. 19a, d). Estos resultados, indican que las células mesenquimales bajo el ectodermo

probablemente empiezan el programa de diferenciación dependiendo del balance entre las señales inhibitorias.

En este estudio, encontramos evidencia que sugiere que la señalización WNT/ β -catenina actúa mediante un gradiente de difusión que se distribuye en dirección de los elementos esqueléticos.

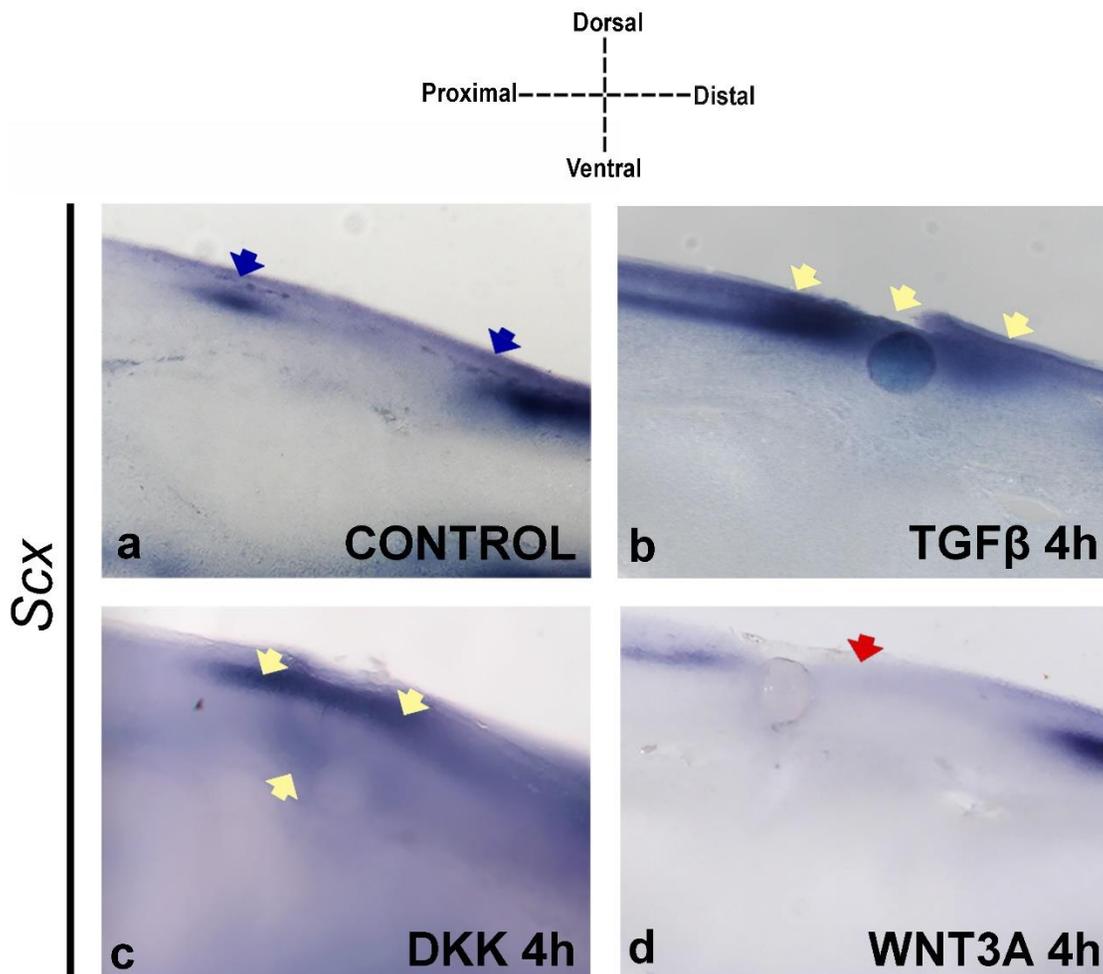


Figura 19. La expresión de Scx depende de la profundidad del tejido mesenquimal entre el ectodermo y los elementos esqueléticos. Hibridaciones *in situ* de la expresión en etapa 28HH en la extremidad control o después de los diferentes tratamientos. a) Cortes sagital después de la hibridación *in situ* de la zona de donde se extiende el EDC. Nótese que la inducción de Scx con los tratamientos de b) TGF β (8/9) y c) DKK (8/8) después de 4 horas. d) Inhibición de la expresión de Scx en el borde del EDC con el tratamiento de WNT3A (7/8). Las flechas azules indican la expresión normal de Scx, las flechas beige indican inducción y las flechas rojas inhibición de Scx.

DISCUSIÓN

Durante la formación de los tendones en la extremidad *Scx* se expresa en poblaciones de células que darán origen a tendones y ligamentos, así mismo, se expresa en subpoblaciones condrogénicas que contribuyen al establecimiento de las uniones de los tendones y ligamentos a sus inserciones esqueléticas (Blitz *et al.*, 2013; Sugimoto *et al.*, 2012; Sugimoto *et al.*, 2013). Aunque la expresión de *Scx* es transitoria en los precursores condrogénicos, en los tendones y ligamentos persiste hasta etapas adultas, por lo que este marcador nos fue de utilidad para evaluar eventos tempranos que marcan el inicio del programa tenogénico empleando el modelo del tendón Extensor Digitorum Communis en extremidades embrionarias de pollo.

Los TGF β son considerados entre los principales reguladores de la diferenciación y el crecimiento de los tejidos conjuntivos, se han usado en la medicina regenerativa con la finalidad de modular la diferenciación de tendón, cartílago y hueso. Existe evidencia de que estos linajes celulares provienen de precursores comunes y que, dependiendo del contexto celular, su progenie adoptará un destino celular (Lorda-Diez, Torre-Pérez, *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2012).

En el contexto del desarrollo, la expresión de TGF β 2 está relacionada a la formación de los tendones y en condiciones *in vitro* TGF β 1 promueve potentemente la expresión de *Scx* (Lorda-Diez, Montero, *et al.*, 2009; Merino *et al.*, 1998). Además, la relevancia de la señalización TGF β en el desarrollo de los tendones se demostró en los ratones *knockout* para *Tgf β 2^{-/-}*, *Tgf β 3^{-/-}*, *Tgf β 2^{-/-}/Tgf β 3^{-/-}* y, en los ratones nulos *Tgf β r2-Prx1Cre* o PRX1-Cre en *Tgf β R2*, donde se observó que la formación de los tendones se afecta ampliamente; no obstante en estos mutantes *Scx* se expresa en su etapa inicial, sin embargo, no se mantiene

la expresión en etapas posteriores (Pryce *et al.*, 2009; Seo and Serra, 2007). La expresión transitoria de *Scx* indica que la inducción inicial de *Scx* es independiente de TGF β .

Estos datos indican que TGF β tiene un papel esencial para mantener activa la transcripción de *Scx* en los precursores de los tendones a lo largo del desarrollo y hasta etapas adultas (Pryce *et al.*, 2009) sugiriendo que TGF β podría ser un factor permisivo para la diferenciación celular. Sin embargo, TGF β no se requiere en las etapas más tempranas de diferenciación de tenogénica, como lo demostramos con los tratamientos simultáneos de DKK en combinación con el inhibidor de ALK o SMAD. Apuntado a que la regulación de la señalización TGF β se ve afectada por la señalización WNT/ β -catenina en etapas tempranas de la diferenciación tenogénica.

En la última década, el creciente interés por caracterizar funcionalmente la regulación de la señalización TGF β se ha centrado en la identificación de los cofactores que dirigen la respuesta de los genes de diferenciación celular (Massagué, 2012; Wu *et al.*, 2016). En cultivos de micromasas de células precursoras obtenidas en etapas tempranas del desarrollo de las extremidades, se observó que TGF β aumenta rápidamente la expresión de los represores *Tgif* y *SnoN*, mismos que se expresan en las articulaciones, tendones y otras zonas donde las células aún no se comprometen a un programa de diferenciación (Lorda-Diez, Montero, *et al.*, 2009; Lorda-Diez *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha descrito que los ligandos como TGF β 2, Nogina y BMP3, inducir la expresión de *Scx* antagonizan la señalización canónica de BMP para (Gamer *et al.*, 2008; Lorda-Diez *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 1998; Schweitzer *et al.*, 2001). Sin embargo, *BMP4* se expresa en los blastemas de los tendones y *GDF5* se expresan en el mesodermo donde se

formarán las inserciones de los ligamentos y tendones. Las funciones de la señalización BMP en los tejidos conectivos fueron esclarecidas en cultivos de micromasas donde se observó que la inducción de *Scx* depende del tiempo de exposición a BMP en combinación con de otras proteínas represoras, como *SnoN* e *Id2* que se expresa en las células mesenquimales de las extremidades, bloqueando el efecto condrogénico. Por lo tanto, la respuesta divergente de las células mesenquimales para diferenciarse al linaje de tendón o de cartílago dependiendo del perfil de expresión de los reguladores de TGF β /BMP en las células mesenquimales (Lorda-Diez *et al.*, 2014).

En el presente estudio, la estrategia de inhibir las dos vías de señalización con los tratamientos simultáneos de DKK con inhibidores de TGF β nos permitieron identificar que no es posible reprimir la expresión de *Scx* bloqueando la señalización TGF β . Por lo tanto, las células precursoras de los tendones adquieren su compromiso celular en el tiempo que se encuentran directamente debajo del ectodermo bajo la influencia de WNT; cuando esta señal cesa, se dispara la cascada molecular que lleva a la diferenciación de tendones.

Los experimentos clásicos donde se colocaba ectodermo sobre células indiferenciadas en distintas condiciones, llevaron a la conclusión de que el ectodermo mantiene la proliferación y el estado indiferenciado de las células de la extremidad (van Amerongen and Nusse, 2009; Gregg *et al.*, 1989; Kardon, 1998; Wolpert, 1998). Esta influencia, puede modificar el perfil de expresión que puede ser activado dependiendo del tiempo que las células mesenquimales han estado bajo su influencia.

La remoción del ectodermo lleva a la expresión ectópica de *Sox9* extendiendo su expresión hacia la región dorsal del mesénquima y, a pesar de que la expresión de *Scx* no fue evaluada (Geetha-Loganathan *et al.*, 2010), se podría especular que en etapas tempranas del desarrollo

de los tendones, al remover el ectodermo muchas de estas células precursoras podrían expresar simultáneamente *Sox9* y *Scx*. Por lo tanto, en condiciones normales, las células cercanas al ectodermo que inician el programa de diferenciación tenogénica serían *Scx⁺/Sox9⁻* mientras que cercanas al esqueleto, estos precursores se vuelven *Scx⁻/Sox9⁺* e inician el programa de diferenciación condrogénica (ten Berge *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014; Sugimoto *et al.*, 2012).

La existencia de fronteras que delimitan los destinos celulares tiene mayor sustento gracias a la identificación y caracterización funcional de *Id2*, un factor de transcripción que responde a WNT y TGF β durante la esquelotogénesis (Lorda-Diez, Torre-Pérez, *et al.*, 2009). Se requieren estudios para evaluar la posibilidad de que la señalización WNT podría regular el destino divergente de las células mesenquimales hacia el linaje tenogénico a través de la regulación de *Id2*. Debido a que BMP induce la expresión de *Dkk1* en el mesénquima de la zona presuntiva de los tendones (Grotewold and Rütther, 2002), otro posible punto de regulación de del fenotipo dual de las células mesenquimales de la extremidad podría ser la regulación de DKK1 como modulador de las vías de señalización WNT/ β -catenina y TGF β en la zona tenogénica.

El modelo de ten Berge, 2009 propone un modelo bidimensional centrado en cómo WNT coordina el ensamblaje de los tejidos dentro de la extremidad en desarrollo. En el modelo propuesto en este trabajo de tesis incluimos la regulación de TGF β para explicar la inducción de los tendones. Aunque la regulación directa de TGF β sobre los precursores de los tendones es clara, no tomamos en cuenta que en las zonas de experimentación BMP4 se expresa en zonas colindantes con las zonas donde se desarrollarán los tendones (Blitz *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2015; Merino *et al.*, 1998; Pizette *et al.*, 2001; Schweitzer *et al.*, 2001). La

interacción WNT/BMP antagonizan los efectos de TGF β debido a que favorecen la degradación de Smad3, lo que a su vez favorece la transcripción de genes de la vía WNT (Fuentealba *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Warner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010), es posible que la disponibilidad de TGF β aumenta la expresión de *Axina2*, de tal manera que se Smad3 puede ser reclutada y favorecer la diferenciación tenogénica.

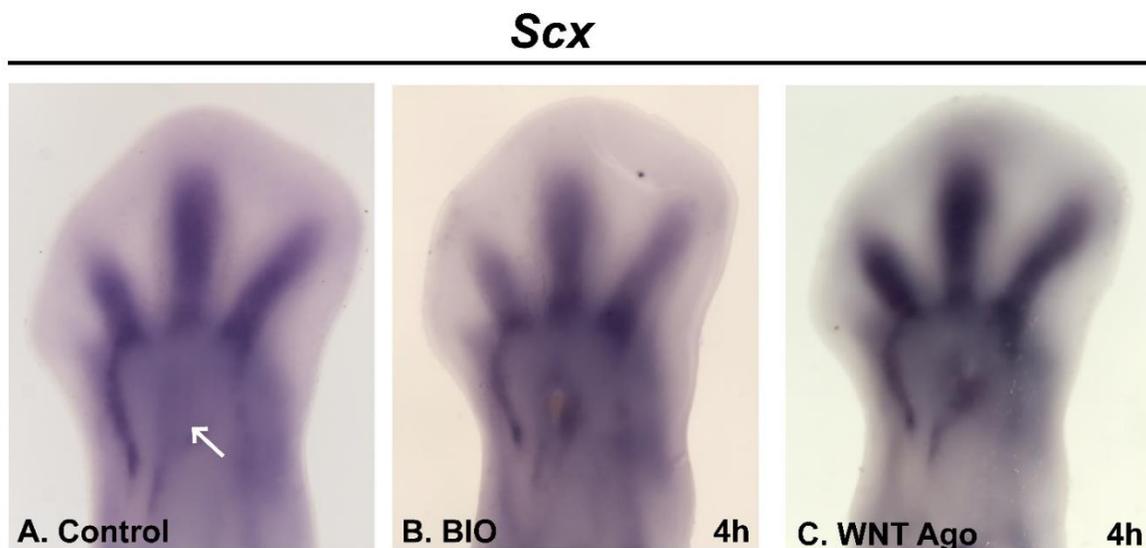


Figura 20. Inducción de *Scx* por BIO y Agonista de Wnt. a) La flecha blanca señala el blastema del tendón EDC en la extremidad control. La activación de la señalización endógena de WNT/ β -catenina b) al inhibir la formación del complejo de degradación de β -catenina (6/8) o c) al favorecer la activación transcripcional TCF7LEF (11/13).

En tenocitos derivados de ratas adultas, los tratamientos con WNT3A y BIO, un inhibidor del complejo de degradación de β -catenina, inhiben la expresión de *Scx*, *Mkx* y *Tnmd* (Kishimoto *et al.*, 2016; Kishimoto *et al.*, 2017), nuestros resultados mostraron que DKK1 induce la expresión de *Scx*. Para evaluar más a detalle la vía de señalización WNT/ β -catenina sobre la regulación de *Scx* en nuestro modelo, se colocaron perlas embebidas en BIO y Agonista de Wnt, un fármaco que impide la ubiquitinación de β -catenina, favoreciendo su acumulación en

el núcleo. En ambos tratamientos observamos la inducción de *Scx* alrededor de la perla en comparación del control (Fig. 20) a diferencia del efecto inhibitorio observado con los tratamientos de WNT3A (Fig. 15b). El posible mecanismo que explicaría esto es que, con la actividad basal de la vía de señalización WNT/ β -catenina los tratamientos con BIO y Agonista de Wnt favorecen la retroalimentación negativa de la vía a través de DKK1 que se expresa en la zona tenogénica presuntiva (Grotewold and Rüther, 2002) y que en nuestros tratamientos detectamos que es suficiente y necesario para inducir la expresión de *Scx*.

Se ha sugerido que la sensibilidad y la capacidad de respuesta de las células a la activación de la vía de señalización TGF β es mediada por el recambio de SMAD3 (Coghlan *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006; Massagué, 2012). Debido a que la forma no activada de SMAD3 es susceptible a degradación proteosómica mediado por GSK3 β y Axina el complejo de degradación, los tratamientos con BIO favorecerían la acumulación de SMAD3 y su posible reclutamiento hacia el núcleo para activar la transcripción de *Scx* (Fig. 20a, b).

Por otro lado, se ha reportado la interacción de SMAD3 en el complejo TCF/LEF durante el establecimiento de las células satélite, así como en la diferenciación de hueso (Letamendia *et al.*, 2001; Rawadi *et al.*, 2003; Warner *et al.*, 2005). Típicamente, la formación del complejo LEF/TCF con β -catenina activa la transcripción de un set de genes característicos de la vía de señalización WNT; sin embargo, se puede activar la transcripción de sets distintos de genes de manera independiente de β -catenina, al interactuar LEF/TCF con SMAD3 (Labbe *et al.*, 2000; Letamendia *et al.*, 2001). Bajo este marco, el Agonista de Wnt podría favorecer la transcripción a través de LEF/TCF activando la transcripción de *Scx* (Fig. 20a, c).

CONCLUSIONES

El contexto molecular de la inducción y diferenciación de los tendones ha sido pobremente caracterizado. A la fecha, se ha abundado en que el inicio del programa tenogénico que se caracteriza por la expresión de *Scx*, factor necesario para el reclutamiento de nuevas células a los tendones en desarrollo. En el presente estudio, el modelo *in ovo* nos permitió analizar los eventos tempranos de diferenciación de una población de los precursores que inician el programa tenogénico de una manera independiente de sus contrapartes musculares y esqueléticas *in vivo*.

Los resultados indican que el ectodermo dirige el establecimiento del programa de diferenciación en los tendones dorsales del autópedo. La posición de las células respecto al ectodermo favorece el inicio de un programa de diferenciación celular hacia tendones o cartílago. En el programa de diferenciación tenogénica, la inhibición de la señalización WNT parece ser un requisito necesario y suficiente para inducir la expresión de *Scx*, mientras que TGF β es necesario para promover y mantener su expresión (Fig. 21a, b).

PERSPECTIVAS

La regulación diferencial de los genes blanco de la vía de señalización WNT y *Scx* en la zona tenogénica presuntiva sugiere que WNT podría actuar como un factor permisivo para el programa de diferenciación tenogénica, queda por esclarecer si la generación de un gradiente de WNT y TGF β , entre el ectodermo y los elementos esqueléticos es requerido para establecer la formación de los tendones entre el ectodermo y los elementos esqueléticos, donde DKK juega un papel esencial para regular ambas vías.

Así mismo, queda esclarecer el papel de otras vías para establecer el fenotipo tenogénico, como la WNT no canónica, que puedan antagonizar la vía canónica de WNT *in vivo*.

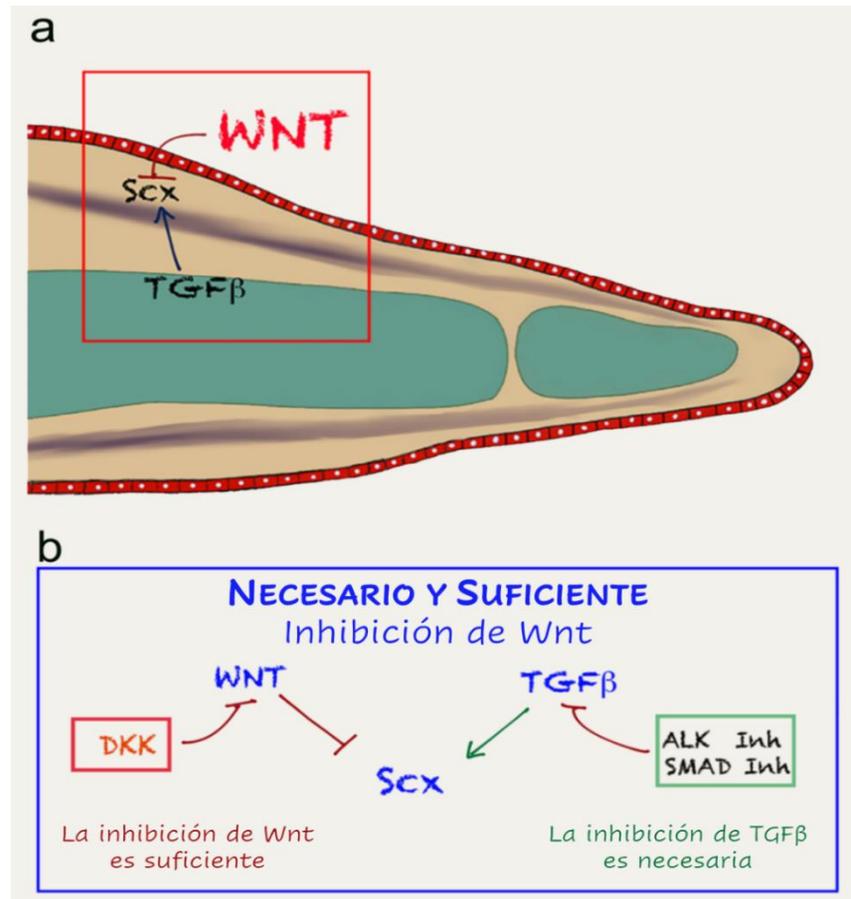


Figura 21. Representación esquemática de la señalización necesaria y suficiente que regula la expresión de Scx. a) Diagrama de las interacciones antagonistas entre las vías de señalización WNT/ β -catenina y TGF β para regular la expresión de Scx. El esquema representa un corte sagital del autópodo de embrión de pollo. El cuadro rojo resalta la liberación de WNT desde el ectodermo y la liberación de TGF β desde los elementos esqueléticos. Ambas señales regulan la expresión de Scx. b) Diagrama representando que la inhibición de la señalización WNT/ β -catenina es suficiente para inducir la expresión de Scx (letras rojas y cuadro rojo con DKK). Respecto a la señalización TGF β , la inhibición de los receptores ALK y los activadores transcripcionales SMAD demuestran que TGF β es necesaria para inducir la expresión (letras y recuadro verde). El cuadro azul integra la interacción del antagonismo entre WNT/ β -catenina y la señalización TGF β . El bloqueo simultáneo de ambas vías de señalización demuestra que la inhibición de WNT/ β -catenina es necesaria y suficiente para inducir la expresión de Scx (letras azules). Las líneas rojas representan inhibición, mientras que las flechas verdes representan inducción.

REFERENCIAS

ABERLE H, BAUER A, STAPPERT J, KISPERT A, KEMLER R (1997). β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*.

AKIYAMA H, CHABOISSIER MC, MARTIN JF, SCHEDL A, DE CROMBRUGGHE 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*.

AKIYAMA H, KIM JE, NAKASHIMA K, BALMES G, IWAI N, DENG JM, ZHANG Z, MARTIN JF, BEHRINGER RR, NAKAMURA T, DE CROMBRUGGHE B (2005). Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

AKIYAMA T (2000). Wnt/ β -catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*.

ALBERTON P, DEX S, POPOV C, SHUKUNAMI C, SCHIEKER M, DOCHEVA D (2015). Loss of tenomodulin results in reduced self-renewal and augmented senescence of tendon stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*.

VAN AMERONGEN R, NUSSE R (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*.

ANDERSON DM, ARREDONDO J, HAHN K, VALENTE G, MARTIN JF, WILSON-RAWLS J, RAWLS A (2006). Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Dev Dyn*.

ASOU Y, NIFUJI A, TSUJI K, SHINOMIYA K, OLSON EN, KOOPMAN P, NODA M (2002). Coordinated expression of scleraxis and Sox9 genes during embryonic development of tendons and cartilage. *J Orthop Res*.

BAFFI MO, MORAN MA, SERRA R (2006). Tgfb2 regulates the maintenance of boundaries in the

axial skeleton. *Dev Biol*.

BAFFI MO, SLATTERY E, SOHN P, MOSES HL, CHYTIL A, SERRA R (2004). Conditional deletion of the TGF- β type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. *Dev Biol*.

BAND AM, LAIHO M (2012). SnoN oncoprotein enhances estrogen receptor- α transcriptional activity. *Cell Signal*.

BENJAMIN M, KAISER E, MILZ S (2008). Structure-function relationships in tendons: A review. *J Anat*.

BENJAMIN M, RALPHS JR (2000). The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol*.

BENJAMIN M, TOUMI H, RALPHS JR, BYDDER G, BEST TM, MILZ S (2006). Where tendons and ligaments meet bone: Attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat*.

TEN BERGE D, BRUGMANN SA, HELMS JA, NUSSE R (2008). Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*.

BEYER C, SCHRAMM A, AKHMETSHINA A, DEES C, KIREVA T, GELSE K, SONNYLAL S, DE CROMBRUGGHE B, TAKETO MM, DISTLER O, SCHETT G, DISTLER JHW (2012). β -catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*.

BHANOT P, BRINK M, SAMOS CH, HSIEH JC, WANG Y, MACKE JP, ANDREW D, NATHANS J, NUSSE R (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a wingless receptor. *Nature*.

BLITZ E, SHARIR A, AKIYAMA H, ZELZER E (2013). Tendon-bone attachment unit is formed

modularly by a distinct pool of Scx-and Sox9-positive progenitors. *Dev*.

BLITZ E, VIUKOV S, SHARIR A, SHWARTZ Y, GALLOWAY JL, PRYCE BA, JOHNSON RL, TABIN CJ, SCHWEITZER R, ZELZER E (2009). Bone Ridge Patterning during Musculoskeletal Assembly Is Mediated through SCX Regulation of Bmp4 at the Tendon-Skeleton Junction. *Dev Cell*.

BOTTINGER EP, LETTERIO JJ, ROBERTS AB (1997). Biology of TGF- β in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int*.

BOURHIS E, TAM C, FRANKE Y, BAZAN JF, ERNST J, HWANG J, COSTA M, COCHRAN AG, HANNOUSH RN (2010). Reconstitution of a Frizzled8-Wnt3a-LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *J Biol Chem*.

BRANDAU O, MEINDL A, FÄSSLER R, ASZÓDI A (2001). A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I. *Dev Dyn*.

BRENT AE, BRAUN T, TABIN CJ (2005). Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development*.

BRENT AE, SCHWEITZER R, TABIN CJ (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*.

BROWN D, WAGNER D, LI XQ, RICHARDSON JA, OLSON EN (1999). Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development*.

CHEN P, CARRINGTON JL, HAMMONDS RG, REDDI AH (1991). Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor β 1 and β 2. *Exp Cell Res*.

CHEN P, CARRINGTON JL, PARALKAR VM, PIERCE GF, REDDI AH (1992). Chick limb bud

mesodermal cell chondrogenesis: Inhibition by isoforms of platelet-derived growth factor and reversal by recombinant bone morphogenetic protein. *Exp Cell Res*.

CHIMAL-MONROY J, ABARCA-BUIS RF, CUERVO R, DÍAZ-HERNÁNDEZ M, BUSTAMANTE M, RIOS-FLORES JA, ROMERO-SUÁREZ S, FARRERA-HERNÁNDEZ A (2011). Molecular control of cell differentiation and programmed cell death during digit development. In *IUBMB Life*

CHIMAL-MONROY J, DE LEÓN LD (1997). Differential effects of transforming growth factors β 1, β 2, β 3 and β 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Int J Dev Biol*.

CHYTIL A, MAGNUSON MA, WRIGHT CVE, MOSES HL (2002). Conditional inactivation of the TGF- β type II receptor using Cre: Lox. *Genesis*.

CLEVERS H, NUSSE R (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*.

COGHLAN MP, CULBERT AA, CROSS DAE, CORCORAN SL, YATES JW, PEARCE NJ, RAUSCH OL, MURPHY GJ, CARTER PS, ROXBEE COX L, MILLS D, BROWN MJ, HAIGH D, WARD RW, SMITH DG, MURRAY KJ, REITH AD, HOLDER JC (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol*.

COHN MJ, TICKLE C (1996). Limbs: A model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet*.

CREASE DJ, DYSON S, GURDON JB (1998). Cooperation between the activin and Wnt pathways in the spatial control of organizer gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

CSERJESI P, BROWN D, LIGON KL, LYONS GE, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, OLSON EN (1995). Scleraxis: A basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*.

D'SOUZA D, PATEL K (1999). Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development. *Anat Embryol (Berl)*.

- DAO DY, YANG X, CHEN D, ZUSCIK M, O'KEEFE RJ (2007). Axin1 and Axin2 are regulated by TGF- β and mediate cross-talk between TGF- β and Wnt signaling pathways. In *Annals of the New York Academy of Sciences*
- DAVEY MG, TICKLE C (2007). The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenet Genome Res* 117: 231–239.
- DEES C, SCHLOTTMANN I, FUNKE R, DISTLER A, PALUMBO-ZERR K, ZERR P, LIN NY, BEYER C, DISTLER O, SCHETT G, DISTLER JHW (2014). The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*.
- DENNIS KJ, MCKINNEY S (1990). Sesamoids and accessory bones of the foot. *Clin Podiatr Med Surg*.
- DOANE KJ, BIRK DE (1991). Fibroblasts retain their tissue phenotype when grown in three-dimensional collagen gels. *Exp Cell Res*.
- DOCHEVA D, HUNZIKER EB, FÄSSLER R, BRANDAU O (2005). Tenomodulin Is Necessary for Tenocyte Proliferation and Tendon Maturation. *Mol Cell Biol*.
- DUDAS M, KIM J, LI WY, NAGY A, LARSSON J, KARLSSON S, CHAI Y, KAARTINEN V (2006). Epithelial and ectomesenchymal role of the type I TGF- β receptor ALK5 during facial morphogenesis and palatal fusion. *Dev Biol*.
- DÜNKER N, KRIEGLSTEIN K (2000). Targeted mutations of transforming growth factor- β genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem*.
- EDOM-VOVARD F, DUPREZ D (2004). Signals Regulating Tendon Formation during Chick Embryonic Development. *Dev Dyn*.
- EDOM-VOVARD F, SCHULER B, BONNIN MA, TEILLET MA, DUPREZ D (2002). Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev Biol*.

- FELSENTHAL N, RUBIN S, STERN T, KRIEF S, PAL D, PRYCE BA, SCHWEITZER R, ZELZER E (2018). Development of migrating tendon-bone attachments involves replacement of progenitor populations. *Dev.*
- FUENTEALBA LC, EIVERS E, IKEDA A, HURTADO C, KURODA H, PERA EM, DE ROBERTIS EM (2007). Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal. *Cell.*
- FURUHASHI M, YAGI K, YAMAMOTO H, FURUKAWA Y, SHIMADA S, NAKAMURA Y, KIKUCHI A, MIYAZONO K, KATO M (2001). Axin Facilitates Smad3 Activation in the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.*
- FURUMATSU T, SHUKUNAMI C, AMEMIYA-KUDO M, SHIMANO H, OZAKI T (2010). Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int J Biochem Cell Biol.*
- GAMER LW, HO V, COX K, ROSEN V (2008). Expression and function of BMP3 during chick limb development. *Dev Dyn.*
- GAÑAN Y, MACIAS D, DUTERQUE-COQUILLAUD M, ROS MA, HURLE JM (1996). Role of TGF β 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.*
- GAUT L, ROBERT N, DELALANDE A, BONNIN MA, PICHON C, DUPREZ D (2016). EGR1 regulates transcription downstream of mechanical signals during tendon formation and healing. *PLoS One.*
- GEETHA-LOGANATHAN P, NIMMAGADDA S, CHRIST B, HUANG R, SCAAL M (2010). Ectodermal Wnt6 is an early negative regulator of limb chondrogenesis in the chicken embryo. *BMC Dev Biol.*
- GEETHA-LOGANATHAN P, NIMMAGADDA S, SCAAL M (2008). Wnt signaling in limb

organogenesis. *Organogenesis*.

GILLESPIE J, ROSS RL, CORINALDESI C, ESTEVES F, DERRETT-SMITH E, MCDERMOTT MF, DOODY GM, DENTON CP, EMERY P, DEL GALDO F (2018). Transforming Growth Factor β Activation Primes Canonical Wnt Signaling Through Down-Regulation of Axin-2. *Arthritis Rheumatol*.

GREGG BC, ROWE A, BRICKELL PM, WOLPERT L (1989). Ectodermal inhibition of cartilage differentiation in micromass culture of chick limb bud mesenchyme in relation to gene expression and cell shape. *Development*.

GROTEWOLD L, RÜTHER U (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* 21: 966–975.

GUERQUIN MJ, CHARVET B, NOURISSAT G, HAVIS E, RONSIN O, BONNIN MA, RUGGIU M, OLIVERA-MARTINEZ I, ROBERT N, LU Y, KADLER KE, BAUMBERGER T, DOURSOUNIAN L, BERENBAUM F, DUPREZ D (2013). Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *J Clin Invest*.

GUO X, DAY TF, JIANG X, GARRETT-BEAL L, TOPOL L, YANG Y (2004). Wnt/ β -catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev*.

GUO X, RAMIREZ A, WADDELL DS, LI Z, LIU X, WANG XF (2008). Axin and GSK3- β control Smad3 protein stability and modulate TGF- β signaling. *Genes Dev*.

HAMBURG-SHIELDS E, DINUOSCIO GJ, MULLIN NK, LAFAYATIS R, ATIT RP (2015). Sustained β -catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes. *J Pathol*.

HAMBURGER V, HAMILTON HL (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*.

- HARTMANN C, TABIN CJ (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*.
- HAVIS E, BONNIN MA, DE LIMA JE, CHARVET B, MILET C, DUPREZ D (2016). TGF β and FGF promote tendon progenitor fate and act downstream of muscle contraction to regulate tendon differentiation during chick limb development. *Dev* 143.
- HEALY C, UWANOGHO D, SHARPE PT (1999). Regulation and role of Sox9 in cartilage formation [In Process Citation]. *Dev Dyn*.
- HUANG AH, RIORDAN TJ, PRYCE B, WEIBEL JL, WATSON SS, LONG F, LEFEBVRE V, HARFE BD, STADLER HS, AKIYAMA H, TUFA SF, KEENE DR, SCHWEITZER R (2015). Musculoskeletal integration at the wrist underlies the modular development of limb tendons. *Dev*.
- HURLE JM, ROS MA, GAÑAN Y, MACIAS D, CRITCHLOW M, HINCHLIFFE JR (1990). Experimental analysis of the role of ECM in the patterning of the distal tendons of the developing limb bud. *Cell Differ Dev*.
- HURLE JM, ROS MA, HINCHLIFFE JR, CRITCHLOW MA, GENIS-GALVEZ JM (1989). The extracellular matrix architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part of the developing chick limb: An ultrastructural, histochemical and immunocytochemical analysis. *Cell Differ Dev*.
- INMAN Gareth J, NICOLÁ FJ, HILL CS (2002). *Nucleocytoplasmic Shuttling of Smads 2, 3, and 4 Permits Sensing of TGF-Receptor Activity The R-Smads appear to be retained in the cytoplasm in.*
- INMAN Gareth J., NICOLÁS FJ, CALLAHAN JF, HARLING JD, GASTER LM, REITH AD, LAPING NJ, HILL CS (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol*

Pharmacol.

ITO Y, TORIUCHI N, YOSHITAKA T, UENO-KUDOH H, SATO T, YOKOYAMA S, NISHIDA K, AKIMOTO T, TAKAHASHI M, MIYAKI S, ASAHARA H (2010). The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

JAKOWLEW SB, CIMENT G, TUAN RS, SPORN MB, ROBERTS AB (1994). Expression of transforming growth factor- β 2 and β 3 mRNAs and proteins in the developing chicken embryo. *Differentiation*.

JHO E, ZHANG T, DOMON C, JOO C-K, FREUND J-N, COSTANTINI F (2002). Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*.

JIAN H, SHEN X, LIU I, SEMENOV M, HE X, WANG XF (2006). Smad3-dependent nuclear translocation of β -catenin is required for TGF- β 1- induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev*.

JINNIN M, IHN H, TAMAKI K (2006). Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor- β 1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol*.

KALSON NS, LU Y, TAYLOR SH, HOLMES DF, KADLER KE (2015). A structure-based extracellular matrix expansion mechanism of fibrous tissue growth. *Elife*.

KARDON G (1998). Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development*.

KARDON G, HARFE BD, TABIN CJ (2003). A Tcf4-positive mesodermal population provides a prepattern for vertebrate limb muscle patterning. *Dev Cell* 5: 937–944.

KIKUCHI A (1999). Roles of axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal*.

KISHIMOTO Y, OHKAWARA B, MIYAMOTO K, ISHIGURO N, OHNO K, SAKAI T (2016). Wnt/ β -catenin signaling contributes to gene expressions related in tendon differentiation and homeostasis. *J Orthop Res*.

KISHIMOTO Y, OHKAWARA B, SAKAI T, ITO M, MASUDA A, ISHIGURO N, SHUKUNAMI C, DOCHEVA D, OHNO K (2017). Wnt/ β -catenin signaling suppresses expressions of Scx, Mxk, and Tnmd in tendon-derived cells. *PLoS One*.

KNOEPFLER PS, CHENG PF, EISENMAN RN (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev*.

KULKARNI AB, HUH CG, BECKER D, GEISER A, LYGH T M, FLANDERS KC, ROBERTS AB, SPORN MB, WARD JM, KARLSSON S (1993). Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

LABBE E, LETAMENDIA A, ATTISANO L (2000). Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

LEFEBVRE V, BEHRINGER RR, DE CROMBRUGGHE B (2001). L-Sox5, Sox6 and SOx9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr Cartil*.

LEJARD V, BLAIS F, GUERQUIN MJ, BONNET A, BONNIN MA, HAVIS E, MALBOUYRES M, BIDAUD CB, MARO G, GILARDI-HEBENSTREIT P, ROSSERT J, RUGGIERO F, DUPREZ D (2011a). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J Biol Chem*.

LEJARD V, BLAIS F, GUERQUIN MJ, BONNET A, BONNIN MA, HAVIS E, MALBOUYRES M, BIDAUD CB, MARO G, GILARDI-HEBENSTREIT P, ROSSERT J, RUGGIERO F, DUPREZ D (2011b). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J Biol Chem*.

- LÉJARD V, BRIDEAU G, BLAIS F, SALINGCARNBORIBOON R, WAGNER G, ROEHRL MHA, NODA M, DUPREZ D, HOUILLIER P, ROSSERT J (2007). Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- α 1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J Biol Chem*.
- LETAMENDIA A, LABBÉ E, ATTISANO L (2001). Transcriptional regulation by smads: Crosstalk between the TGF- β and Wnt pathways. In *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*
- LI Y, LU W, KING TD, LIU CC, BIJUR GN, BU G (2010). Dkk1 stabilizes wnt co-receptor LRP6: Implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS One*.
- LIU H, ZHANG C, ZHU S, LU P, ZHU T, GONG X, ZHANG Z, HU J, YIN Z, CHIN HENG B, CHEN X, WEI OUYANG H (2015). Mohawk promotes the tenogenesis of mesenchymal stem cells through activation of the TGF β signaling pathway. *Stem Cells*.
- LIU H, ZHU S, ZHANG C, LU P, HU J, YIN Z, MA Y, CHEN X, OUYANG H (2014). Crucial transcription factors in tendon development and differentiation: Their potential for tendon regeneration. *Cell Tissue Res*.
- LIU W, RUI H, WANG J, LIN S, HE Y, CHEN M, LI Q, YE Z, ZHANG S, SIU CC, CHEN YG, HAN J, LIN SC (2006). Axin is a scaffold protein in TGF- β signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. *EMBO J*.
- LIU W, WATSON SS, LAN Y, KEENE DR, OVITT CE, LIU H, SCHWEITZER R, JIANG R (2010). The Atypical Homeodomain Transcription Factor Mohawk Controls Tendon Morphogenesis. *Mol Cell Biol*.
- LOGAN CY, NUSSE R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- LONGOBARDI L, LI T, MYERS TJ, O'REAR L, OZKAN H, LI Y, CONTALDO C, SPAGNOLI A (2012). TGF- β Type II Receptor/MCP-5 Axis: At the Crossroad between Joint and Growth Plate

Development. *Dev Cell*.

LORDA-DIEZ CI, MONTERO JA, CHOE S, GARCIA-PORRERO JA, HURLE JM (2014). Ligand- and stage-dependent divergent functions of BMP signaling in the differentiation of embryonic skeletogenic progenitors in vitro. *J Bone Miner Res*.

LORDA-DIEZ CI, MONTERO JA, GARCIA-PORRERO JA, HURLE JM (2010). Tgf2 and 3 are coexpressed with their extracellular regulator Ltbp1 in the early limb bud and modulate mesodermal outgrowth and BMP signaling in chicken embryos. *BMC Dev Biol*.

LORDA-DIEZ CI, MONTERO JA, MARTINEZ-CUE C, GARCIA-PORRERO JA, HURLE JM (2009). Transforming growth factors β coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme. *J Biol Chem*.

LORDA-DIEZ CI, TORRE-PÉREZ N, GARCÍA-PORRERO JA, HURLE JM, MONTERO JA (2009). Expression of Id2 in the developing limb is associated with zones of active BMP signaling and marks the regions of growth and differentiation of the developing digits. *Int J Dev Biol*.

MACCABE JA, ERRICK J, SAUNDERS JW (1974). Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol*.

MARTINI R, SCHACHNER M (1991). Complex expression pattern of tenascin during innervation of the posterior limb buds of the developing chicken. *J Neurosci Res*.

MASSAGUÉ J (1998). TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Biochem*.

MASSAGUÉ J (2012). TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

MERINO R, GAÑAN Y, MACIAS D, ECONOMIDES AN, SAMPATH KT, HURLE JM (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGF β s, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol*.

MERINO R, MACIAS D, GAÑAN Y, RODRIGUEZ-LEON J, ECONOMIDES AN, RODRIGUEZ-ESTEBAN C, IZPISUA-BELMONTE JC, HURLE JM (1999). Control of digit formation by activin signalling. *Development*.

MURCHISON ND, PRICE BA, CONNER DA, KEENE DR, OLSON EN, TABIN CJ, SCHWEITZER R (2007). Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development*.

NILSSON JA, CLEVELAND JL (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*.

NUSSE R, CLEVERS H (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*.

OKUBO T, KNOEPFLER PS, EISENMAN RN, HOGAN BLM (2005). Nmyc plays an essential role during lung development as a dosage-sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation. *Development*.

OLSON TR, PAWLINA W (2008). *A.D.A.M. Student Atlas of Anatomy*.

OTA S, ZHOU ZQ, KEENE DR, KNOEPFLER P, HURLIN PJ (2007). Activities of N-Myc in the developing limb link control of skeletal size with digit separation. *Development*.

PACKARD M, MATHEW D, BUDNIK V (2003). Wnts and TGF β in synaptogenesis: Old friends signalling at new places. *Nat Rev Neurosci*.

PARDALI E, GOUMANS MJ, TEN DIJKE P (2010). Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*.

PASSERIEUX E, ROSSIGNOL R, LETELLIER T, DELAGE JP (2007). Physical continuity of the perimysium from myofibers to tendons: Involvement in lateral force transmission in skeletal muscle. *J Struct Biol*.

PATEL K, NITTENBERG R, D'SOUZA D, IRVING C, BURT D, WILKINSON DG, TICKLE C (1996).

Expression and regulation of Cek-8, a cell to cell signalling receptor in developing chick limb buds. *Development*.

PEARSE R V., SCHERZ PJ, CAMPBELL JK, TABIN CJ (2007). A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol*.

PEIFER M, PAI LM, CASEY M (1994). Phosphorylation of the drosophila adherens junction protein armadillo: Roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol*.

PIZETTE S, ABATE-SHEN C, NISWANDER L (2001). BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*.

PROETZEL G, PAWLOWSKI SA, WILES M V., YIN M, BOIVIN GP, HOWLES PN, DING J, FERGUSON MWJ, DOETSCHMAN T (1995). Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet*.

PRYCE BA, BRENT AE, MURCHISON ND, TABIN CJ, SCHWEITZER R (2007). Generation of transgenic tendon reporters, ScxGFP and ScxAP, using regulatory elements of the scleraxis gene. *Dev Dyn*.

PRYCE BA, WATSON SS, MURCHISON ND, STAVEROSKY JA, DÜNKER N, SCHWEITZER R (2009). Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFB signaling are essential for tendon formation. *Development*.

QI Z, HEIDI E, VÉRONIQUE L, BENOIT de C (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental Dynamics*.

RAWADI G, VAYSSIÈRE B, DUNN F, BARON R, ROMAN-ROMAN S (2003). BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop. *J Bone Miner*

Res.

RIFKIN DB (2005). Latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteins: Orchestrators of TGF- β availability. *J Biol Chem.*

ROS MA, DELGADO MD, LEON J (1995). Lack of correlation between c-myc expression and programmed or experimentally-induced cell death during chick limb development. *Int J Dev Biol.*

RUBIN L, SAUNDERS JW (1972). Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: Constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev Biol.*

SAKABE T, SAKAI K, MAEDA T, SUNAGA A, FURUTA N, SCHWEITZER R, SASAKI T, SAKAI T (2018). Transcription factor scleraxis vitally contributes to progenitor lineage direction in wound healing of adult tendon in mice. *J Biol Chem.*

SANFORD LP, ORMSBY I, GITTENBERGER-DE GROOT AC, SARIOLA H, FRIEDMAN R, BOIVIN GP, CARDELL E Lou, DOETSCHMAN T (1997). TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development.*

SAWAI S, SHIMONO A, WAKAMATSU Y, PALMES C, HANAOKA K, KONDOH H (1993). Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse. *Development.*

SCHIELE NR, MARTURANO JE, KUO CK (2013). Mechanical factors in embryonic tendon development: Potential cues for stem cell tenogenesis. *Curr Opin Biotechnol.*

SCHOFIELD JN, WOLPERT L (1990). Effect of TGF- β 1, TGF- β 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res.*

SCHWEITZER R, CHYUNG JH, MURTAUGH LC, BRENT AE, ROSEN V, OLSON EN, LASSAR A, TABIN CJ (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons

and ligaments. *Development*.

SCHWEITZER R, ZELZER E, VOLK T (2010). Connecting muscles to tendons: Tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development*.

SEMĚNOV M, TAMAI K, HE X (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*.

SEO HS, SERRA R (2007). Deletion of Tgfbr2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev Biol*.

SHUKUNAMI C, OSHIMA Y, HIRAKI Y (2001). Molecular cloning of tenomodulin, a novel Chondromodulin-I related gene. *Biochem Biophys Res Commun*.

SHUKUNAMI C, TAKIMOTO A, NISHIZAKI Y, YOSHIMOTO Y, TANAKA S, MIURA S, WATANABE H, SAKUMA T, YAMAMOTO T, KONDOH G, HIRAKI Y (2018). Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Sci Rep*.

SHUKUNAMI C, TAKIMOTO A, ORO M, HIRAKI Y (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol*.

SMITS P, LEFEBVRE V (2003). Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Development*.

SOEDA T, DENG JM, DE CROMBRUGGHE B, BEHRINGER RR, NAKAMURA T, AKIYAMA H (2010). Sox9-expressing precursors are the cellular origin of the cruciate ligament of the knee joint and the limb tendons. *Genesis*.

SOLURSH M, SINGLEY CT, REITER RS (1981). The influence of epithelia on cartilage and loose connective tissue formation by limb mesenchyme cultures. *Dev Biol*.

- SPAGNOLI A, O'REAR L, CHANDLER RL, GRANERO-MOLTO F, MORTLOCK DP, GORSKA AE, WEIS JA, LONGOBARDI L, CHYTIL A, SHIMER K, MOSES HL (2007). TGF- β signaling is essential for joint morphogenesis. *J Cell Biol.*
- SPÄTER D, HILL TP, O'SULLIVAN RJ, GRUBER M, CONNER DA, HARTMANN C (2006). Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Development.*
- STAMOS JL, WEIS WI (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*
- STROSCHEIN SL, WANG W, ZHOU S, ZHOU Q, LUO K (1999). Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science (80-)*.
- SUGIMOTO Y, TAKIMOTO A, AKIYAMA H, KIST R, SCHERER G, NAKAMURA T, HIRAKI Y, SHUKUNAMI C (2012). Scx+/Scx9+ progenitors contribute to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament. *Dev.*
- SUGIMOTO Y, TAKIMOTO A, HIRAKI Y, SHUKUNAMI C (2013). Generation and characterization of ScxCre transgenic mice. *Genesis.*
- SUZUKI H, ITO Y, SHINOHARA M, YAMASHITA S, ICHINOSE S, KISHIDA A, OYAIZU T, KAYAMA T, NAKAMICHI R, KODA N, YAGISHITA K, LOTZ MK, OKAWA A, ASAHARA H (2016). Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- T. F, J.A. H, A.M. L, V.R. E, S. S (2003). Nonuniform strain of human soleus aponeurosis-tendon complex during submaximal voluntary contractions in vivo. *J Appl Physiol.*
- TABIN C, WOLPERT L (2007). Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev.*
- TAKIMOTO A, ORO M, HIRAKI Y, SHUKUNAMI C (2012). Direct conversion of tenocytes into

chondrocytes by Sox9. *Exp Cell Res.*

TECALCO-CRUZ AC, RÍOS-LÓPEZ DG, VÁZQUEZ-VICTORIO G, ROSALES-ALVAREZ RE, MACÍAS-SILVA M (2018). Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.*

THOROGOOD P V., HINCHLIFFE JR (1975). An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol.*

TOZER S, DUPREZ D (2005). Tendon and ligament: Development, repair and disease. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.*

TSUIKI H, KISHI K (1999). Retinoid-induced limb defects 2: Involvement of TGF- β 2 in retinoid-induced inhibition of limb bud development. *Reprod Toxicol.*

VOLK T (1999). Singling out Drosophila tendon cells: A dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet.*

WARNER DR, GREENE RM, PISANO MM (2005). Cross-talk between the TGF β and Wnt signaling pathways in murine embryonic maxillary mesenchymal cells. *FEBS Lett.*

WARNER DR, MUKHOPADHYAY P, BROCK GN, PIHUR V, PISANO MM, GREENE RM (2011). TGF β -1 and Wnt-3a interact to induce unique gene expression profiles in murine embryonic palate mesenchymal cells. *Reprod Toxicol.*

WEI J, MELICHIAN D, KOMURA K, HINCHCLIFF M, LAM AP, LAFYATIS R, GOTTARDI CJ, MACDOUGALD OA, VARGA J (2011). Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipodystrophy: A novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.*

WILLIAMS BO, INSOGNA KL (2009). Where Wnts went: The exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res.*

WOLPERT L (1998). Pattern formation in epithelial development: The vertebrate limb and feather bud spacing. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*.

WOLPERT L (1990). Signals in limb development: STOP, GO, STAY and POSITION. In *Journal of Cell Science*

WU M, CHEN G, LI YP (2016). TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*.

YAMAMOTO-SHIRAISHI YI, KUROIWA A (2013). Wnt and BMP signaling cooperate with Hox in the control of Six2 expression in limb tendon precursor. *Dev Biol*.

YIN H, CACERES MD, YAN Z, SCHIEKER M, NERLICH M, DOCHEVA D (2019). Tenomodulin regulates matrix remodeling of mouse tendon stem/progenitor cells in an ex vivo collagen I gel model. *Biochem Biophys Res Commun*.

YOSHIMOTO Y, TAKIMOTO A, WATANABE H, HIRAKI Y, KONDOH G, SHUKUNAMI C (2017). Scleraxis is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. *Sci Rep*.

YOSHIZAWA T, TAKIZAWA F, IIZAWA F, ISHIBASHI O, KAWASHIMA H, MATSUDA A, ENDO N, KAWASHIMA H (2004). Homeobox Protein Msx2 Acts as a Molecular Defense Mechanism for Preventing Ossification in Ligament Fibroblasts. *Mol Cell Biol*.

ZHANG AY, CHANG J (2003). Tissue engineering of flexor tendons. *Clin Plast Surg*.

ZHANG M, WANG M, TAN X, LI TF, ZHANG YE, CHEN D (2010). Smad3 prevents β -catenin degradation and facilitates β -catenin nuclear translocation in chondrocytes. *J Biol Chem*.

ZHANG W, XU Y, ZHANG L, WANG S, YIN B, ZHAO S, LI X (2018). Synergistic effects of TGF β 2, WNT9a, and FGFR4 signals attenuate satellite cell differentiation during skeletal muscle development. *Aging Cell*.

ZHOU S (2011). TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*.

ZHU X, ZHU H, ZHANG L, HUANG S, CAO J, MA G, FENG G, HE L, YANG Y, GUO X (2012). Wnt-mediated Wnts differentially regulate distal limb patterning and tissue morphogenesis. *Dev Biol*.