



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**LA SEÑALIZACIÓN DE WNT5A-Ca<sup>2+</sup>-CaN-NFAT ES UN FACTOR PERMISIVO  
DURANTE EL DESARROLLO DE LOS DEDOS.**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**ALEJANDRO FARRERA HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. JESÚS CHIMAL MONROY**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE**  
**AREA DE NEURODESARROLLO Y FISIOLÓGÍA, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**  
**CELULAR**  
**DR. MARTHA ROBLES FLORES**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA**

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



## **Agradecimientos**

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento de los proyectos de CONACyT 53484 y 168642, y a los proyectos de DGAPA-UNAM IN213314 y IN211117. Gracias al programa de beca Doctoral que me fue otorgado por CONACyT y a los apoyos PAEP que me hicieron posible la asistencia a distintos congresos que favorecieron mi formación durante el doctorado.

Todo el trabajo que hice en estos años se lo debo en gran parte al apoyo y cariño constante que recibí de parte de mi familia. Las frecuentes preguntas que me has hecho Javier contribuyeron a buscar en profundidad sobre mi tema de estudio y en integrar información de utilidad. Las largas charlas que tuvimos Eloísa me enfocaron en seguir adelante en la investigación y han contribuido en decidirme por este camino. Toda la retroalimentación que hemos tenido Mónica, ambos siendo biólogos, me enriquecieron bastante (junto a tus últimas revisiones de esta tesis) y me alegra saber que sigas mejorando cada día hermanita. Madre hermosa, tu atención a mis ideas descabelladas desde la infancia me han motivado siempre, nunca dejas de estar a mi lado en los mejores y los peores momentos. Y al final Padre, tu sembraste la curiosidad científica en mí, y no solo eso, sin tu ayuda y paciencia jamás hubiera concluido este trabajo. Han sido mi núcleo esencial desde que nací y los amo con todo mi corazón.

Al resto de mi familia les doy las gracias por generar un ambiente ideal de convivencia. De verdad no es fácil ver un apoyo como el nuestro. El entorno que vamos creando me da una estabilidad para lograr mis objetivos.

Agradezco al grupo de Laboratorio, mis tutoras, los/las sinodales, a mi amiga la maestra Marcía Bustamante, a Lucía Brito de biblioteca y al Dr. Miguel Tapia de microscopía por su contribución importante en la realización, análisis y conclusión de este proceso de investigación. También agradezco a los profesores que me enseñaron a lo largo de los semestres y cambiaron muchas ideas y perspectivas que tenía antes de iniciar este periodo de vida.

Y para ti Moni, el amor de mi vida, el simple hecho de tenerte cerca de mí me permite ver el resto de la vida de manera más sencilla y los retos como algo posible. La conclusión de este proyecto se sintió mucho más ligera con todo tu cariño, apoyo, atención y paciencia. Contigo y la pequeña Sofí (y los mininos) hemos expandido el ambiente familiar que tanto aprecio ¡Las amo!

# ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
Abstract.....	8
Resumen .....	9
Introducción .....	11
Extremidades en los vertebrados: anatomía básica y su contribución adaptativa. ....	11
Desarrollo embrionario de los elementos esqueléticos de la extremidad. ....	15
Las vías señalización de la familia TGF $\beta$ , BMP y Activina.....	18
WNT en la comunicación celular y vías de señalización. ....	21
Coordinación entre proliferación, condrogénesis y apoptosis en el autópodo. ....	26
La señalización WNT en el desarrollo de la extremidad .....	52
Las vías WNT/PCP y su participación en el desarrollo de la extremidad. ....	54
La señalización WNT/Ca <sup>2+</sup> en la condrogénesis.....	60
Justificación .....	63
Hipótesis .....	64
Objetivos.....	64
Materiales y Métodos.....	65
Manipulación de embriones de pollo. ....	65
Tinción de cartílago. ....	67
Hibridación <i>in situ</i> en embriones completos.....	68
Medición de Ca <sup>2+</sup> en cultivo celular. ....	69

Visualización del Ca <sup>2+</sup> intracelular e inyección de proteínas.....	69
Inmunofluorescencia.....	71
Tinción de LysoTracker.....	72
Resultados.....	74
Relación entre las proteínas WNT y la señalización de Ca <sup>2+</sup> en la condrogénesis cerca de la zona indiferenciada. ....	74
WNT5A incrementa el Ca <sup>2+</sup> citoplasmático en la zona indiferenciada. ....	78
WNT5A participa en la condrogénesis a través de la señalización Ca <sup>2+</sup> -CaN- NFAT .....	83
La señalización de WNT5A/Ca <sup>2+</sup> actúa como factor permisivo en la inducción a cartílago favorecida por TGFβ en la zona indiferenciada del interdígito. ....	86
Participación de la señalización WNT5A-CaN-NFAT en el tejido interdigital para la diferenciación a cartílago. ....	89
El mantenimiento de la condrogénesis por la vía WNT-CaN-NFAT es independiente de la muerte celular.....	92
Discusión .....	97
Conclusión.....	103
Perspectivas .....	104
Referencias.....	105

## Abreviaturas

AAZ	Anterior Apoptotic Zone (Zona Apoptótica Anterior)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AER	Apical Ectodermal Ridge (Cresta Ectodérmica Apical)
APC	Proteína Adenomatous Poliposys Coli
ARE	Activin Response Element (Elemento de Respuesta a Activina)
ARF	Activin Responsive Factor (Factor Responsivo a Activina)
Axin	Axis Inhibitor (proteína de inhibición del eje corporal)
BMP	Bone Morphogenetic protein (Proteína morfogénica de hueso)
BAMBI	BMP y activin membrane-bound inhibitor (Inhibidor de BMP y activina unido a la membrana)
CAMK II	Calmodulin Kinase (Calmodulin cinasa) II
CK1 $\alpha$	Casein Kinase (Cinasa de caseína) 1 alfa
Cy3	Colorante de Cianina 3

DAPI	Colorante de núcleo 4'6'-diamino-2-fenilindol di-hidroclórico
DC/PFR	Digit Crescent/Phalanx Forming Region (Crescente Digital o Región Formadora de Falanges)
DKK1	Proteína Dickkopf 1
DMSO	Di-metil Sulfóxido
DVL	Proteína Dishevelled
Fgf8	Fibroblast Growth Factor (Gen del Factor de Crecimiento de Fibroblastos) 8
FZ4	Gen del receptor WNT Frizzled 4
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 beta (Cinasa Sintetasa de Glucógeno 3 beta)
IAZ	Interdigital Apoptotic Zone (Zona Apoptótica Interdigital)
IHH	Factor de crecimiento y diferenciación Indian Hedgehog
JNK	Jun Kinases (Cinasa de JUN)
LEF	Lymphoid enhancer Binding Factor (Factor de unión al potenciador linfoide)
LRP	Lipoprotein Receptor Protein (Receptor de lipoproteínas)
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells (Factor nuclear de los linfocitos T activados)

OP	Opac Patch (Parche Opaco)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Amortiguador salino de fosfatos)
PKC	Protein Kinase C (Cinasa de Proteínas C)
PLC	Phospholipase C (Fosfolipasa C)
PAZ	Posterior Apoptotic Zone (Zona Apoptótica Posterior)
ROR2	Robinow Orphan Receptor (Receptor huérfano del síndrome robinow) 2
SFRP1	Soluble Frizzled Receptor Protein 1 (Proteína frizzled soluble 1)
SMAD	Mensajero secundario de la familia TGF $\beta$ . Unión de las abreviaturas Mothers against Decapentaplegic (madres contra Decapentaplegico) y Small Body Size (cuerpo pequeño).
SOX9	Gen para el factor de transcripción de la región del cromosoma sexual Y 9
TCF	T-Cell Factor (Factor de los linfocitos T)
TGF $\beta$	Trasforming Growth Factor beta (Proteína del factor de crecimiento transformante beta)
VANGL	Receptor de la familia de proteínas Van-Gogh

WIF	WNT Inducible Factor (Factor inducido por WNT)
WISP	WNT Inducible Signaling Pathway Protein 1 (Proteína Inducida por la señalización WNT)
WNT3A	Proteína Wntless/Int 3, subunidad A
WNT5A	Proteína Wntless/Int 5, subunidad A

## Abstract

In the embryonic development of vertebrates, the limbs start the morphogenesis as a bud, where the digital formation will be regulated. In the most distal region, or the undifferentiated zone, the cells receive signals from the apical ectodermal ridge (AER), promoting cell proliferation. Once the cells divide in these zone, the farthest cells from the apical signals take two destinies, the cartilage formation in the digits or the programmed cell death in the interdigit. The cartilage formation in the skeleton is characterized by the expression of *Sox9*, but the balance between proliferation and differentiation in the undifferentiated zone is regulated, in great measure, by the extracellular WNT proteins. The canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling maintains the limb outgrowth by inducing *Fgf8* in the AER but repress *Sox9* in the undifferentiated zone. In contrast, WNT5A is reported to activate the WNT/PCP signaling pathway and also antagonize WNT/ $\beta$ -catenin, allowing the cartilage formation indirectly. Even with the advances made, the role of WNT5A in the undifferentiated zone and the activation of other pathways is still unknown. To know if WNT5A regulates the levels of intracellular  $Ca^{2+}$  and their target molecules in the undifferentiated zone cells, the intracellular  $Ca^{2+}$  was measured through a fluorescent dye. It was found that WNT5A increase the levels of  $Ca^{2+}$  after 5min and the inhibition by the WNT antagonist sFRP1 reduces  $Ca^{2+}$ . After observing the role of WNT5A with  $Ca^{2+}$ , the molecules sensible to it like Calcineurin (CaN) and NFAT was blocked pharmacologically in response the expression of *Sox9* was reduced resulting in shorter digits after treatment. In contrast, applying treatments with WNT5A increases the expression of *Sox9* and the levels of the protein NFAT.

Finally, In the present work it was demonstrated that WNT5A acts as permissive factor for the chondrogenesis in the undifferentiated zone, to promote the Sox9 expression after the induction by TGF $\beta$ .

## Resumen

En el desarrollo embrionario de los vertebrados, la extremidad inicia su morfogénesis como un primordio, donde se va regulando la formación de los dedos. En la región distal o zona indiferenciada se reciben señales desde la cresta ectodérmica apical (AER), promoviendo la división celular. Una vez que las células se dividen en dicha zona, las células alejadas de las señales apicales toman dos destinos, la formación de cartílago en los dedos o la muerte celular programada en el interdígito. La formación del esqueleto cartilaginoso está caracterizada por la expresión de Sox9, pero el balance entre la proliferación y diferenciación en la zona indiferenciada es regulado, en gran medida, por las proteínas extracelulares WNT. La vía de señalización canónica WNT/ $\beta$ -catenina mantiene la AER induciendo la expresión de *Fgf8* en el ectodermo distal, pero reprime a Sox9 en la zona indiferenciada. En contraste, WNT5A activa la señalización WNT/PCP y antagoniza la señalización WNT/ $\beta$ -catenina, permitiendo así la formación de cartílago de forma indirecta. A pesar de los avances previos se desconoce el papel de WNT5A en la zona indiferenciada y si regula por otras vías de señales. Para saber si WNT5A contribuye en regular los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular y sus moléculas blanco en células de la zona indiferenciada se midieron a través de un colorante fluorescente los cambios de Ca<sup>2+</sup> intracelular y se mostró que WNT5A

aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  a los 5min y la inhibición con el antagonista WNT (sFRP1) los reduce. Al observar que WNT5A sí participa en modificar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se bloquearon moléculas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  como Calcineurina y NFAT, se observó una inhibición de Sox9 y una reducción en el tamaño de los dedos, en contraste con al aumento de Sox9 y NFAT provocado por tratamientos con WNT5A. Finalmente, en el presente trabajo se demostró que WNT5A actúa como un factor permisivo de la condrogénesis en la zona indiferenciada, para promover la expresión de Sox9 posterior a la inducción por  $\text{TGF}\beta$ .

## Introducción

### **Extremidades en los vertebrados: anatomía básica y su contribución adaptativa.**

Las extremidades son estructuras que confieren diversas ventajas adaptativas a los vertebrados: dan protección a los órganos vitales, contribuyen a percibir los cambios en el entorno, permiten el desplazamiento de forma eficiente en diversos tipos de ambiente y facilitan la obtención de recursos necesarios para la supervivencia del organismo (Hildebrand, 1982). La diversidad morfológica, del mismo patrón esquelético de la extremidad, ha permitido ocupar distintos nichos y estilos de locomoción. Por mencionar algunos ejemplos las extremidades han permitido: manipular diversidad de objetos con la mano humana, nadar en el ambiente acuático para los delfines, la carrera en la pradera para los caballos, excavar los suelos en los topos, incluso permite el desplazamiento en el aire con las alas del murciélago (Darwin, 1859) .

El número de extremidades pareadas varía según el grupo. En el caso de los peces pueden crecer hasta 6 extremidades. En los vertebrados terrestres hay cuatro extremidades clasificadas como extremidades anteriores y posteriores. En algunos casos particulares ocurre la pérdida de extremidades como en los cetáceos, donde se ha perdido el par posterior o las serpientes donde se han perdido ambos pares o se mantiene un esbozo del par posterior (Hinchliffe y Jhonson, 1980).

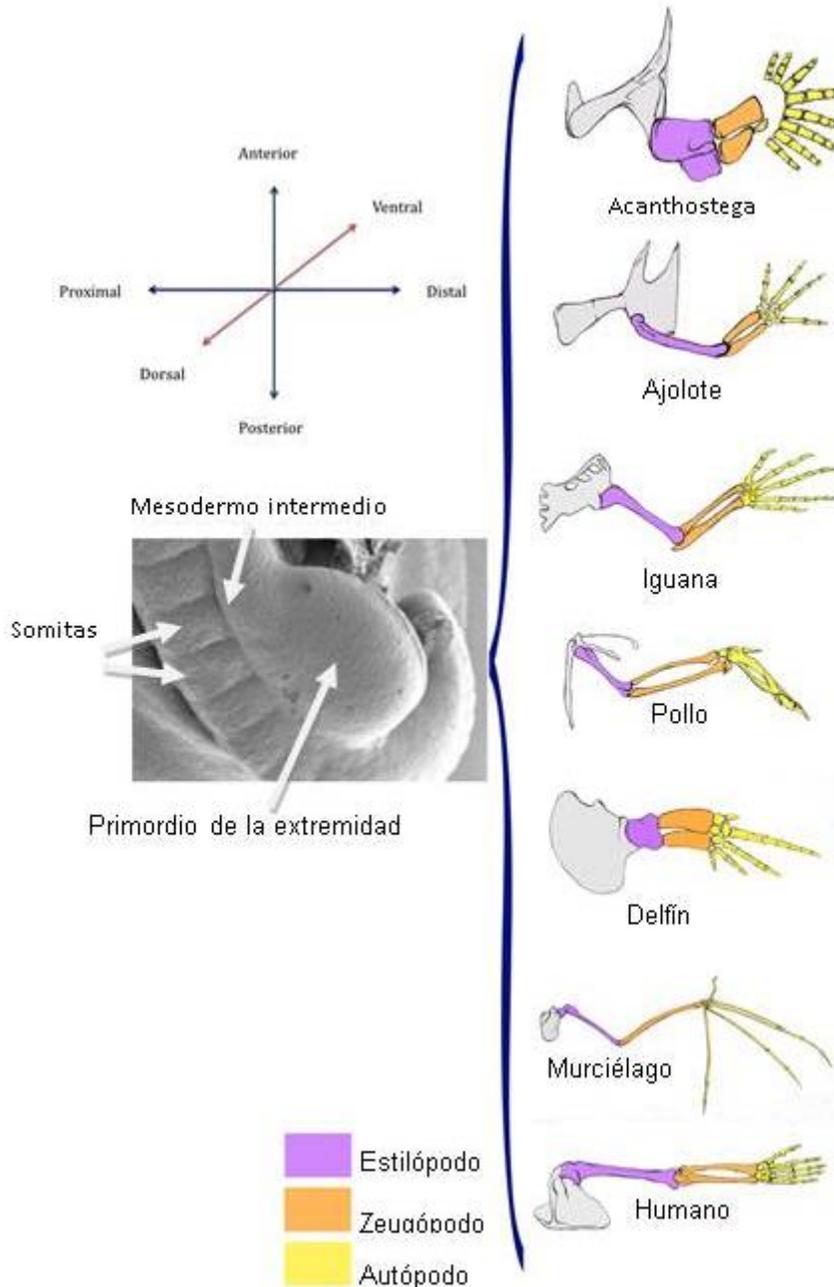
La anatomía básica de las extremidades está compuesta de diversos tejidos distribuidos en distintas áreas. Los más internos son un conjunto de elementos

esqueléticos que contienen: tejido óseo, cartílago y ligamentos. En la parte media está el tejido muscular compuesto de varias fibras contráctiles que permiten el movimiento, las fibras están envueltas en paquetes de tejido conectivo y se conectan al hueso por los tendones. Entre los músculos hay redes de vasos sanguíneos y linfáticos que limpian, nutren y oxigenan el resto de los tejidos. A un lado de los vasos están los nervios, los cuales permiten recibir las sensaciones del exterior y la posición del cuerpo, además de controlar la contracción muscular. En la región más externa está la piel compuesta de tejido adiposo, dermis y epidermis. La piel da protección, evita la pérdida de líquidos y electrolitos y mantiene la temperatura. Así mismo, puede contribuir en el desplazamiento, como es el caso de membranas para nadar o plumas para volar (Hildebrand, 1982).

Para facilitar la comprensión del estudio de las extremidades, se han definido tres ejes para ubicar las estructuras anatómicas espacialmente (Figura 1). El eje antero-posterior se define a partir de la zona de la cabeza hacia el fin de la columna vertebral, pero en la extremidad se define al pulgar como el más anterior y el dedo meñique como el más posterior (para ubicar cada dedo en todos los grupos de vertebrados se clasifican con números romanos iniciando con el pulgar). En el eje dorso-ventral va de la espalda hacia el abdomen. En la extremidad se distinguen las uñas, plumas o escamas como la parte dorsal y la palma o los cojinetes comprenden la parte ventral. El eje próximo-distal distingue como la parte proximal a la más cercana de la columna vertebral, como es el caso del hombro y la cadera, la región distal corresponde a la punta de los dedos (Gilbert y Barresi, 2016).

El cambio en el orden y distribución de estos tejidos y estructuras definen toda la gama de tipos de movimiento. A pesar de esta variedad morfológica, a nivel estructural comparten un patrón similar en la disposición del esqueleto, el cual está evolutivamente conservado. En general las extremidades poseen el estilópodo, correspondiente al húmero (a nivel anterior) o fémur (en la región posterior); el zeugópodo, correspondiente al radio y ulna (a nivel anterior) o tibia y fibula (en la región posterior); y el autópedo con un número muy variable de elementos esqueléticos en los carpos, metacarpos y falanges (a nivel anterior) o tarsos y metatarsos y falanges (en la región posterior), pero en ambos casos los dedos tienen falanges (Gilbert y Barresi, 2016; Figura 1).

El estudio del desarrollo de las extremidades permite entender varios fenómenos fisiológicos, la evolución y la clasificación de los vertebrados terrestres. Gracias al conocimiento embriológico se ha relacionado a especies que antes se pensaban ajenas (Gilbert y Barresi, 2016). Pero también, ha contribuido a saber más de las causas en varias enfermedades del aparato locomotor, como son la artritis, la atrofia muscular, el enanismo y la braquidactilia, ente otros (Hall, 2005).



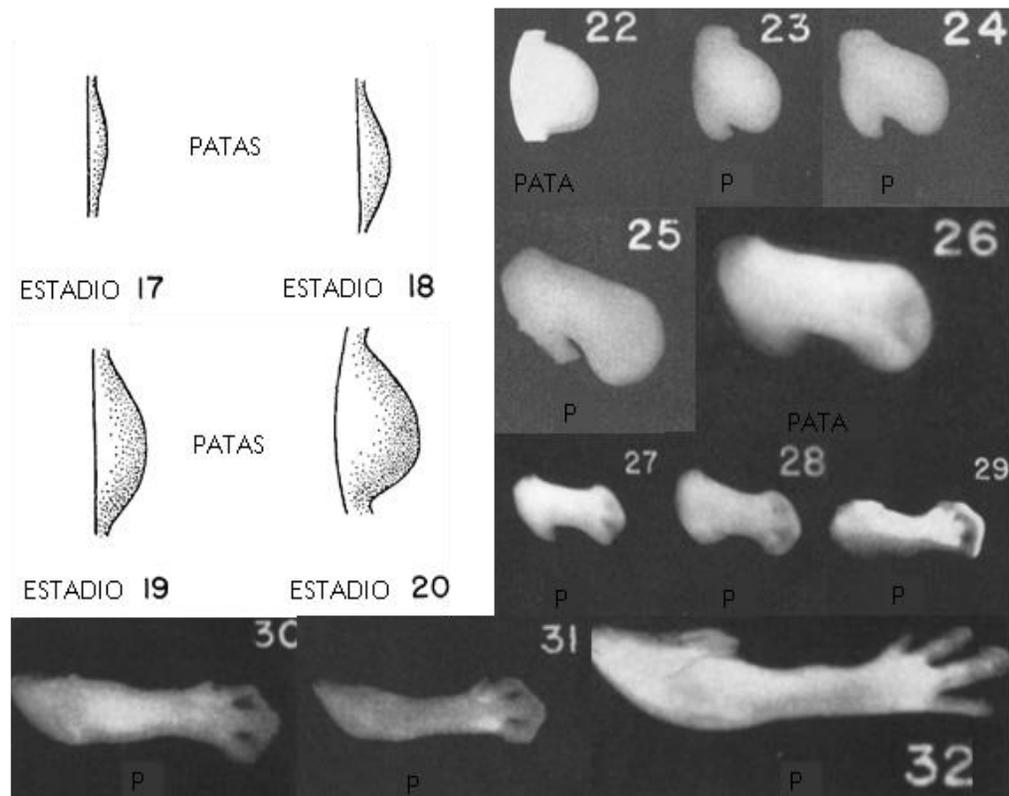
**Figura 1.** Representación de las extremidades de diferentes grupos de vertebrados donde se sugiere una estructura embrionaria homóloga, el primordio de la extremidad. En colores se marcan los elementos esqueléticos, el color guinda representa el estilópodo, el naranja el zeugópodo y el amarillo el autópodo. Aunque los tipos de locomoción cambian, el patrón básico del esqueleto es similar (Tomada de Abarca-Buis, *et al.* 2009).

## **Desarrollo embrionario de los elementos esqueléticos de la extremidad.**

La primera evidencia morfológica de las extremidades embrionarias es una proyección del costado, con forma semi-redondeada y ligeramente aplanada en el eje dorso-ventral llamada primordio de la extremidad (Slack, 2013; Figura 1). Esta estructura es muy similar en todos los vertebrados, incluyendo los peces. En la Figura 1 también se observan las somitas (paquetes con forma rectangular similar a las vértebras), las cuales darán origen al tejido muscular de la extremidad en etapas posteriores (Gilbert y Barresi, 2016). Entre el primordio y las somitas se encuentra el mesodermo intermedio, el cual dará origen al pronefros pero también contribuye para el crecimiento del primordio de la extremidad. El mesodermo intermedio aporta señales que modificaran el tejido ectodérmico y favorecen la división celular para iniciar la proyección del tejido (Tabin y Wolpert, 2007).

El estudio de la formación embrionaria de la extremidad se divide por estadios clasificados por su forma, se reconocen 45 estadios en total (Hamburger y Hamilton, 1951). En el inicio de la formación de la extremidad, en la etapa 17, el embrión de pollo comienza con el engrosamiento del ectodermo distal en un epitelio estratificado, la cresta ectodérmica apical o AER por sus siglas en inglés (Saunders, 1948). Este proceso es seguido por una rápida proliferación celular del mesodermo sub-ectodérmico en la etapa 19 donde ya se observa una protuberancia. Después, este tejido crece y forma una paleta redondeada hasta el estadio 22, donde incrementa la proporción de mitosis en la parte posterior generando una estructura asimétrica, proyectada hacia la parte posterior (Tabin y Wolpert, 2007). En el estadio 25 el primordio se flexiona por la rodilla y el codo,

cuando se articula el estilópodo con el zeugópodo (Holder, 1977). A su vez, se forma la paleta del autópedo, generando ángulos en la región de los dedos, distinguiéndose primero en la parte posterior y después en la anterior. Por último, se generarán indentaciones en los interdígitos que separan los dedos en los estadios 30 a 34 (**Figura 2**).



**Figura 2.** Tabla de estadios en el desarrollo de la extremidad posterior del embrión de pollo mostrando los cambios ocurridos desde etapa 17 hasta la etapa 32. Basada en las modificaciones morfológicas según las condiciones de incubación descritas en el trabajo de Hamburger y Hamilton (1951).

Para el estudio de la formación del esqueleto, es importante entender la generación del cartílago en la extremidad. El esqueleto embrionario adquiere su morfología a partir de moldes de tejido cartilaginoso. Posterior a este evento, el elemento esquelético prolifera y madura a la pre-hipertrofia en el centro del

elemento, donde detendrá la secreción de proteínas de cartílago y sus células comenzarán a crecer en volumen. Después pasará a la hipertrofia en el centro del molde cartilaginoso, donde los condrocitos mueren y los osteocitos invaden la zona, este proceso es conocido como osificación endocondral (Karsenty y Wagner, 2002).

La morfogénesis de la extremidad está controlada en sus etapas tempranas por tres procesos celulares bien definidos: la proliferación del tejido más distal del primordio conocido como zona indiferenciada (Tabin y Wolpert, 2007), la condrogénesis (donde se adquiere el patrón de los elementos esqueléticos) y la muerte celular programada en zonas donde se moldeará por completo la morfología general de la extremidad (Montero y Hurler, 2010). En coordinación con las primeras fases, los tendones se diferencian en posición dorso-ventral al esqueleto cartilaginoso y de las somitas hay una migración de células mioblásticas junto a axones de la medula espinal para invadir el esqueleto, formando la musculatura. En las siguientes secciones se describirán procesos de desarrollo relacionados con los cambios celulares y moleculares que ocurren en la extremidad embrionaria para dar origen a los elementos esqueléticos. Para entender el destino de los tejidos se explicarán primero algunas vías de señalización celular importantes en el control de los procesos moleculares responsables de iniciar y regular las fases iniciales del desarrollo del primordio.

## **Las vías señalización de la familia TGF $\beta$ , BMP y Activina.**

La señalización celular por TGF $\beta$  involucra a una numerosa familia de ligandos extracelulares y receptores que regulan una amplia diversidad de procesos bioquímicos en las células desde la formación embrionaria hasta enfermedades degenerativas propias en organismos de edad avanzada. Los ligandos se dividen en tres grupos: Factores de crecimiento transformante (TGFs, subdivididos en los tipos  $\alpha$  y  $\beta$ ), proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y las activinas (Massagué, 1998). Los ligandos de esta familia comparten una similitud en su secuencia de aminoácidos compuesta de dos dominios de unión al receptor conectados por un tercer dominio abundante en cisteína, o también llamado nodo de cisteína (Griffith *et al.*, 1996), el cual les permite unir cada ligando a un correceptor distinto favorece la formación del complejo receptor-ligando.

Las células reciben las señales con los receptores transmembranales divididos en tipo I y tipo II. Los ligandos TGF $\beta$  o activina viajan extracelularmente en forma de dímeros y son reconocidos inicialmente por el receptor tipo II. Una vez unidos los ligandos, dos receptores tipo II se unen a un par de receptores tipo I, formando un tetrámero (Wrana *et al.*, 1994; ten Dijke *et al.*, 1995). En el caso de BMPs, a diferencia de los receptores para TGF $\beta$  y activina, el tetrámero de receptores se forma al mismo tiempo (Attisano *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1994). Cuando el complejo está unido, las regiones intracelulares inician su actividad enzimática en sus dominios con actividad cinasa de serina y treonina (Massagué *et al.*, 1998). El receptor tipo I tiene una secuencia única denominada GS (por su abundancia en Glicina y serina), este dominio es fosforilado por el receptor tipo II (Wrana *et al.*,

1994). De la misma forma, la región cinasa del receptor II se autofosforila. Una vez activo todo el tetrámero, el receptor tipo I inicia la cascada de señalización intracelular.

Los receptores son regulados por distintas proteínas extracelulares u otras ancladas a la membrana plasmática. El  $\beta$ -glicano, también conocido como receptor tipo III o receptor antena, aumenta la señalización al unirse a receptores tipo I, mientras Endogлина tiene el mismo efecto al unirse al receptor tipo II (López-Casillas *et al.*, 1991; McAllister *et al.*, 1994). En contraste, la proteína de membrana BAMBI es una variante del receptor tipo I de BMP (BMPRIb), la cual carece de los dominios cinasa y GS. Con dicha modificación las proteínas BMP reconocen este receptor falso, pero no se activan los mensajeros intracelulares por lo que se bloquea la señalización (Oncihthouck *et al.*, 1999). Los antagonistas extracelulares comprenden a: antagonista de activinas Folistatina, y los antagonistas de BMP Chordin, Gremlin y Noggin (de Winter *et al.*, 1996; Piccolo *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1996).

La principal forma de transducción de señales para TGF $\beta$ /BMP/Activina es a través de la familia SMAD (Macías Silva *et al.*, 1996). Las proteínas SMAD (Abreviatura de la fusión de los nombres MAD, mutante en *Drosophila*, y SMA, descrito en *C. elegans*; Sekelsky *et al.*, 1995; Savage *et al.*, 1996). La secuencia proteica de este grupo tiene 3 dominios: MH1, Linker y MH2. En el momento donde los receptores inician la señalización, las SMAD son activadas en la región MH2 por el dominio cinasa del receptor tipo I (Kretschmar *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996). La vía de señalización de TGF $\beta$  y Activina es a través de la fosforilación

de SMAD 2 y 3 mientras las BMP lo hacen con SMAD 1, 5 y 8 (Liu *et al.*, 1996; Nakao *et al.*, 1997). Se pueden ocupar anticuerpos para ambos grupos de SMAD fosforiladas y así determinar que vía esta activada (Montero *et al.*, 2008). Una vez fosforiladas, las SMAD son reconocidas por la Co-SMAD (por lo general SMAD 4, independientemente del ligando), facilitando su transporte al núcleo (Lagna *et al.*, 1996).

Otros tipos de SMAD actúan como inhibidores intracelulares de la señalización, este es el caso de SMAD6 y SMAD7. Su papel es unirse a las SMAD fosforiladas y bloquear la interacción con su Co-SMAD, inhibiendo la señalización. SMAD6 inhibe más específicamente a BMPs y SMAD7 inhibe ambas vías (Abdollah *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997).

Las SMADs reconocen a nivel nuclear las proteínas Fast1 y ARF, unidos a los elementos ARE en el ADN (Chen *et al.*, 1996). Otras proteínas nucleares que interaccionan con SMAD son SP1, P21 y el complejo AP1 (Datto *et al.*, 1996). Una vez formado el complejo nuclear, la señalización TGF $\beta$  puede inducir la expresión de diversos genes, entre ellos: colágenas, elastina o receptores de ácido retinoico (Ritzenthaler *et al.*, 1993; Marigo *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996). Debido a la regulación de componentes de matriz extracelular por TGF $\beta$ /BMP/Activina, existe una estrecha regulación de la vía en procesos como fibrosis, proliferación celular y morfogénesis embrionaria (Border y Rouslahti, 1992; Massagué *et al.*, 1996, Chimal-Monroy *et al.*, 2003).

## **WNT en la comunicación celular y vías de señalización.**

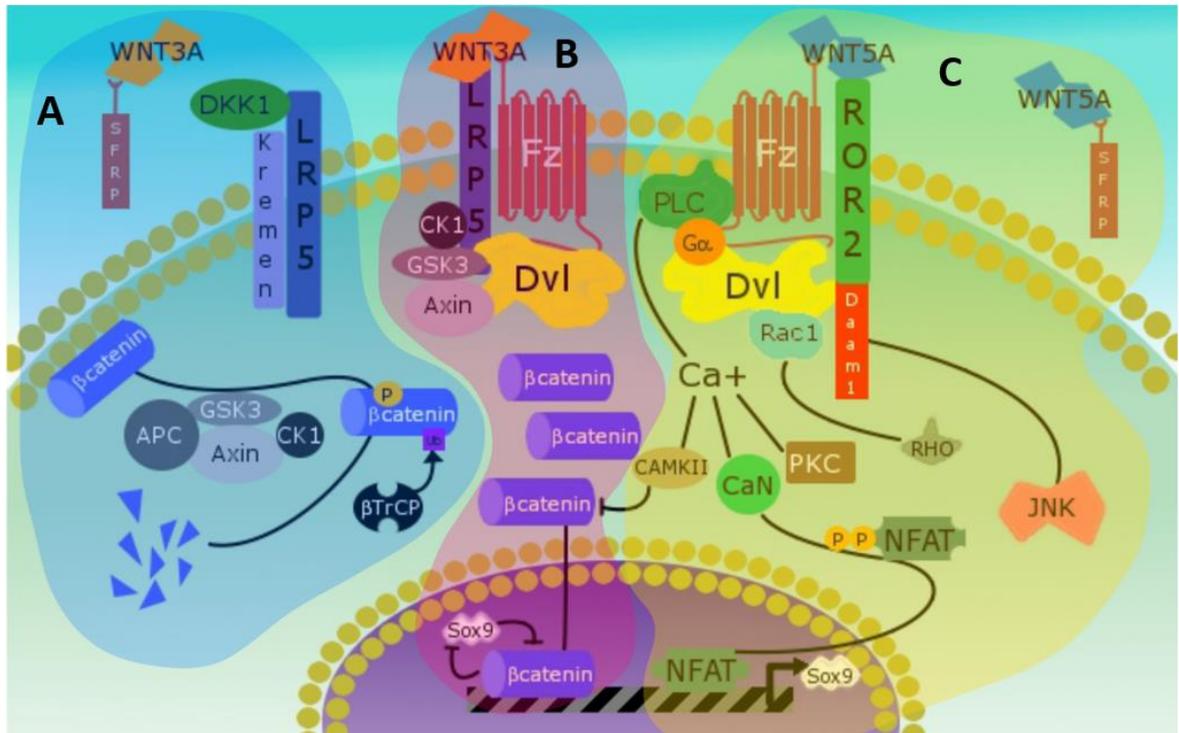
Las proteínas WNT constituyen un grupo de factores extracelulares que regulan varios procesos en el desarrollo embrionario, están involucradas en la iniciación, la extensión, la formación de patrones y la diferenciación celular del primordio de la extremidad (Yang, 2003). La familia WNT está compuesta por 19 proteínas distintas, las cuales interaccionan con los 10 miembros de la familia de receptores Frizzled (FZ). A su vez, los receptores se acoplan a distintos tipos de correceptores, entre ellos están: LRP5/6, RYK, ROR2 o VANGL2 (Figura 3) y participan en regular la activación de las distintas vías de señalización WNT (Oishi *et al.*, 2003; Bilic *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2010)

La primera vía de señalización descrita regula los niveles de  $\beta$ -catenina, por lo cual se nombra vía de señalización canónica o vía WNT/ $\beta$ -catenina. La proteína  $\beta$ -catenina actúa como un coactivador de factores de transcripción en el núcleo, lo que promueve la expresión de varios genes. En ausencia de WNT, la  $\beta$ -catenina forma un complejo con Axin, APC, la cinasa de caseína 1 alfa ( $CK1\alpha$ ) y la glucógeno sintasa cinasa 3 beta ( $GSK3\beta$ ) donde la  $\beta$ -catenina es fosforilada. La  $\beta$ -catenina fosforilada es reconocida por  $\Delta\beta$ -TRCP para ser degradada en el proteosoma y así reducir el nivel de esta proteína en la célula (Zeng *et al.*, 2005).

Cuando están presentes las proteínas WNT, se forma un complejo con el receptor FZ, el cual se acopla al dominio Dix y PDZ de la proteína intracelular Dishevelled (DVL). Una vez activo DVL, se acopla con Axin,  $GSK3\beta$  y  $CK1\alpha$  para fosforilar al correceptor LRP5/6. Cuando está formado el complejo proteico membranal,  $\beta$ -catenina ya no es marcada para degradación y puede ser acumulada en el

citoplasma (Aberle *et al.* 1997; Figura 3). Después, la  $\beta$ -catenina es trasladada al núcleo donde interacciona con el factor de transcripción TCF y LEF para regular la expresión genética. Los ligandos WNT más comunes de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina son WNT1, WNT3A WNT4, WNT6, WNT7A y WNT9A (Rudnicki *et al.*, 1997; Hartmann y Tabin, 2001; ten Berge *et al.*, 2008).

La proteína  $\beta$ -catenina también está presente en el complejo de adhesión celular de la membrana plasmática que une el citoesqueleto con la matriz extracelular. En el complejo de adhesión celular, la N-Cadherina se une a la fibronectina de la matriz extracelular e intracelularmente se une con  $\alpha$  y  $\beta$  catenina, donde la  $\beta$ -catenina se mantiene unida a los filamentos de actina del citoesqueleto (Ozawa *et al.*, 1990). El acoplamiento del complejo de adhesión es otra forma de mantener los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina alejados del núcleo y de aumentar la condensación celular (Delise y Tuan, 2002).



**Figura 3.** Vías de señalización WNT. (A) En la parte izquierda (sombreado azul) se muestra el destino de,  $\beta$ -catenina en ausencia de WNT o en presencia de sus antagonistas. Con los antagonistas, como sFRP1 y DKK1, WNT3A no puede unirse a su receptor y correceptor. En este contexto,  $\beta$ -catenina interacciona con GSK3 $\beta$  y es fosforilada para ser ubiquitinada por  $\Delta\beta$ -TRCP y ser degradada. (B) En el centro se muestra la vía de señalización canónica de WNT (sombreado rojo). Cuando WNT3A se acopla a FZ se recluta LRP5/6 y se activa la señalización canónica. En la parte intracelular se forma un complejo con DVL y el grupo de fosforilación de  $\beta$ -catenina. Al quedar el complejo unido a DVL se evita la degradación de  $\beta$ -catenina y esta proteína se acumula en el citoplasma, favoreciendo su transporte al núcleo y formar complejos con factores de transcripción. (C) Del lado derecho (sombreado amarillo) se muestran las vías de señalización no canónicas y su antagonista sFRP1. En este caso, WNT5A interacciona con diferentes coreceptores como ROR2. Ese complejo activa de forma distinta a DVL y permite la activación de RHO, JNK e incrementa los niveles de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma. En el caso de la acumulación de Ca<sup>2+</sup>, se activa Calcineurina, la cual desfosforila NFAT y permite su transporte al núcleo para favorecer la transcripción de proteínas distintas a la señalización canónica, en este caso se ejemplifica con la expresión de Sox9.

Las rutas no canónicas WNT actúan de forma independiente a la estabilización de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y activan otros mecanismos de comunicación

intracelular. Para cambiar entre una ruta y otra, las proteínas WNT interactúan en la membrana celular donde FZ forma un complejo con LRP5/6 para activar preferentemente la vía WNT/ $\beta$ -catenina o se acopla con el correceptor ROR2 para activar las vías no canónicas de WNT. Dependiendo el tipo de WNT se formará un complejo receptor-correceptor distinto y por lo tanto se activará una vía diferente (Groumolato *et al.*, 2010). Los miembros WNT5A, WNT5B y WNT11 activan la señalización no canónica y reconocen principalmente a FZ2, FZ4 y FZ9 (Heisenberg *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2003; Oishi *et al.*, 2003; Mikels y Nusse, 2006). Una vez que ROR2 está acoplado con FZ, se forma un complejo con los dominios PDZ y DEP de DVL para acoplar a Rac1, Daam1 y PKC (Nishita *et al.*, 2010; Corda, 2017; Figura 3).

Se han clasificado al menos 3 tipos de señalización no canónica. Una vía es denominada La señalización de polaridad celular planar o WNT/PCP la cual controla la morfología celular y cambia la distribución de proteínas en la célula favoreciendo la migración a través de cambios en el citoesqueleto. En el núcleo, la cinasa de jun (JNK) activada por WNT y ROR2 fosforila al factor de transcripción c-jun y permite su acoplamiento con el complejo AP-1 (Boutros *et al.*, 1998; Hikasa *et al.*, 2002; Nishita *et al.*, 2010). La segunda vía no canónica es WNT/Rho, relacionada en aumentar las actinas y miosinas contráctiles del citoesqueleto y aumentar la adhesión celular por el acoplamiento cadherina-integrina, aunque algunos autores las consideran una sola vía con PCP (Fanto *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2006). La tercera vía actúa a través de incrementar los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, denominada vía WNT/ $Ca^{2+}$ . En esta última vía, Frizzled activa a PLC,

permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y aumentan los niveles de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma. Una vez liberado, el  $\text{Ca}^{2+}$  activa a las enzimas PKC, CAMKII y calcineurina, esta última enzima es una fosfatasa que activa al factor de transcripción NFAT, por desfosforilación de la región amino terminal, para promover su transporte al núcleo y la expresión de varios genes (Sheldal *et al.*, 1999; Kuhl *et al.*, 2000; Saneyoshi *et al.*, 2002; Figura 3).

La señalización WNT se regula finamente con una variedad de antagonistas. Las proteínas secretadas SFRP y WIF1 bloquean el reconocimiento de las proteínas WNT con su receptor FZ (Hsiehi *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 2006). Las proteínas DKK y SOST interaccionan con LRP5/6 para unirse con Kremen y evitar la unión con FZ e inhibir a la señalización WNT/ $\beta$ -catenina (Glinka *et al.*, 1998; Figura 3). Otros antagonistas extracelulares son Wisp, Cerberus (el cual inhibe tanto WNT como BMP). Dentro del núcleo, Groucho se acopla con TCF en el ADN y reprime su actividad transcripcional. Al momento que  $\beta$ -catenina se traslada al núcleo se remueve Groucho de TCF para permitir la transcripción (Kawano *et al.*, 2003). Otro mecanismo para inhibir a las WNT es fosforilando  $\beta$ -catenina para su degradación a través de Siah2 en el citoplasma o a nivel nuclear SOX9 recluta el complejo  $\text{CK1}\alpha$  y  $\text{GSK3}\beta$  para inhibir la actividad canónica de WNT (Topol *et al.*, 2003 y 2008).

## **Coordinación entre proliferación, condrogénesis y apoptosis en el autópodo.**

### *Participación de la cresta ectodérmica apical y la zona indiferenciada.*

El primordio de la extremidad crece desde la placa lateral del mesodermo (tejido sub-ectodérmico a los costados del embrión). Fuera del área de la extremidad no se forman primordios en los flancos de manera normal. Cuando se trasplantan primordios de extremidad a otros sitios de la placa lateral del mesodermo se desarrolla una extremidad completa con todas las estructuras óseas, musculares y ectodérmicas (Harrison, 1918). El mesénquima de la extremidad dará origen al esqueleto y tejidos conectivos (ligamentos, capas envolventes de los músculos y tendones) de las extremidades, pero los músculos provienen de los mioblastos, que migran al primordio desde las somitas (Saunders, 1948; Ordahl y Le Dourain, 1992; ten Berge *et al.*, 2008). Estos estudios ayudan a comprender que una vez iniciado el primordio tiene toda la información necesaria para desarrollar el esqueleto de la extremidad.

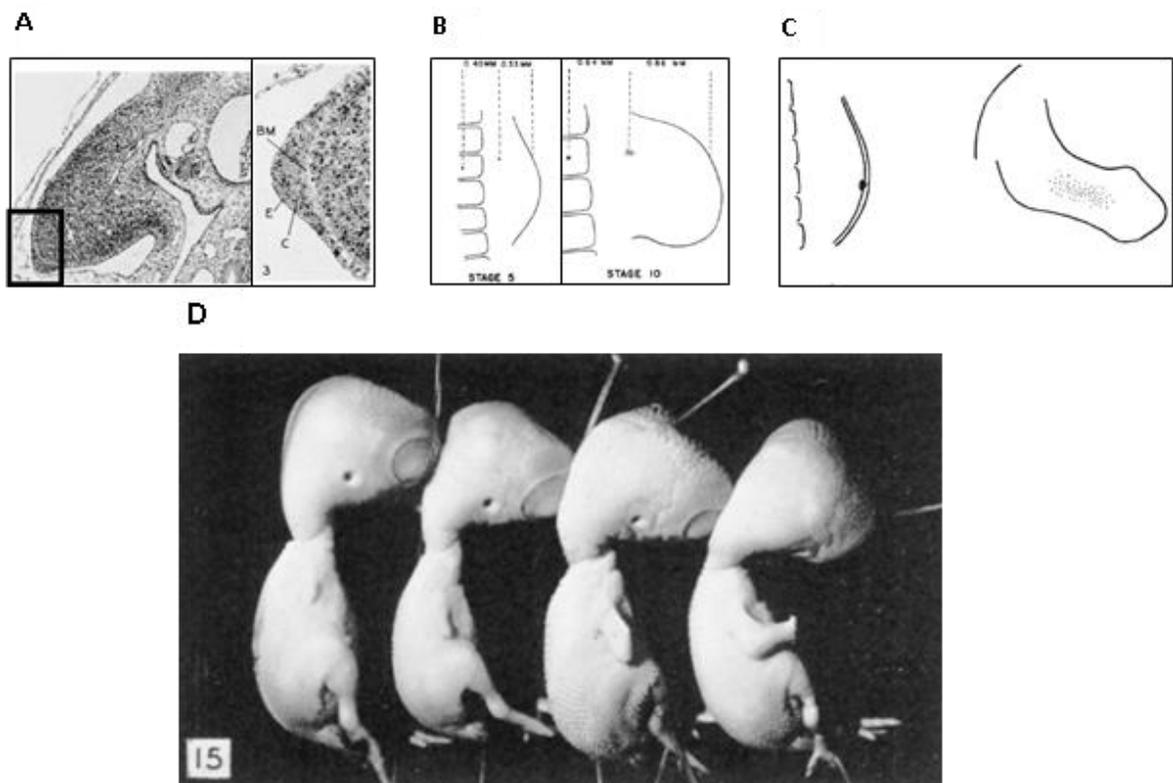
Momentos previos a la formación del primordio, se observa el engrosamiento del ectodermo, la futura AER. Las células mesodérmicas, en respuesta a las señales de la AER, aceleran su tasa de división celular, permitiendo la proyección del primordio de la extremidad (Saunders, 1948; Figura 4A). Esta comunicación es fundamental para el correcto desarrollo de la extremidad. Al colocar marcas de carbón en el mesénquima del primordio para identificar el destino celular se observa que las marcas proximales se mantienen proporcionalmente en la misma

zona (Figura 4B). Pero si se colocan las marcas justo debajo de la AER se distribuye por toda la extremidad, por lo que el origen de las células del esqueleto en la extremidad es en la zona más distal del primordio (Saunders, 1948; Figura 4C). En estudios posteriores se demostró que un marcaje vital de las células de la zona distal, mantiene la tinción en las falanges a los días posteriores (Suzuki *et al.*, 2008). Este dato indica que las células del mesénquima distal, alejadas de la AER paulatinamente por la proliferación, se diferencian en las células del esqueleto y los tejidos conectivos presentes en la futura extremidad.

Cuando se extirpa la AER en el estadio 18 de la extremidad se detiene el crecimiento y el desarrollo por completo, confirmando la importancia de la interacción ectodermo-mesodermo. Si se retira en el estadio 20, el primordio formará solo el estilópodo de la extremidad, si se retira en estadio 24 se forma parte del zeugópodo y así sucesivamente (Saunders, 1948; Figura 4D). Este descubrimiento indica que al avanzar existe una información posicional en la región proximal, por lo que al retirar la AER en etapas más avanzadas se logran formar elementos esqueléticos.

Cuando se trasplantó la AER de la extremidad anterior hacia la posterior o de una AER de edad avanzada a un primordio más joven se descubrió que las extremidades no cambiaban en su patrón de elementos esqueléticos (Rubin y Saunders, 1972). Debido a que las células de la AER no parecen contribuir en establecer la información posicional del esqueleto, se ha enfocado a la región distal del mesénquima en un tema de interés y debate en la formación de la extremidad (Tabin y Wolpert, 2007). Según el modelo de la zona de progreso (Summerbell, 1975), cuando las células salen de esa zona inician su compromiso

hacia la formación de elementos esqueléticos, dependiendo del tiempo en que se mantuvieron en presencia de las señales de la AER. Las primeras células en alejarse de la AER formaran el estilópodo, seguidas por las células del zeugópodo y finalmente las células restantes formaran el autómodo. Pero, como se verá más adelante, el estudio de los mecanismos moleculares mostró una mayor complejidad en el proceso del establecimiento del eje próximo-distal.



**Figura 4.** La AER es necesaria para la iniciación del desarrollo de la extremidad. (A) Se muestra un corte histológico y el acercamiento (recuadro negro) donde se presta atención a la AER en vista sagital. (B) Marcaje con polvo de carbón en una región proximal de la extremidad y su localización en estadios posteriores. (C) El marcaje de carbón por debajo de la AER y como se distribuye a lo largo de la extremidad en las siguientes etapas. (D) Según en la etapa de desarrollo en la cual se retira la AER, menos estructuras esqueléticas forma y la extremidad es más corta si se realiza en etapas tempranas. Si se retira a estadios más avanzados del desarrollo se forman los elementos esqueléticos más distales. (A y B) (Modificada de Saunders, 1948).

Para entender las bases moleculares de la comunicación mesénquima-AER en la formación del eje próximo-distal se han usado diversas estrategias. El cultivo celular, el estudio de ligandos extracelulares y mutaciones genéticas dirigidas han sido métodos de ayuda para la comprensión del desarrollo embrionario. En un principio, debido a las limitaciones técnicas de la época, los trasplantes de partes de la extremidad y los cultivos *in vitro* fueron los métodos más usados (Harrison, 1918; Saunders, 1948; Summerbell, 1972). Posteriormente, con los avances en biología molecular se han logrado comprender varios de los mecanismos moleculares responsables de las distintas fases de elongación de la extremidad y del establecimiento de los segmentos estilópodo, zeugópodo y autópedo en el eje próximo-distal. Se han identificado las moléculas responsables de la comunicación extracelular necesaria para procesos como el crecimiento y control de la diferenciación celular (Aono *et al.*, 1988; Niswander *et al.*, 1994; Cohn *et al.*, 1995; Crossley *et al.*, 1996). Pero, un tema de interés en años recientes es el control en la información posicional, sobre todo el conocer cómo es que las células generan grupos comprometidos para formar una estructura determinada como el húmero o el pulgar (Summerbell, 1975; Yokohuchi *et al.*, 1991; Capdevilla *et al.*, 1999; Dudley *et al.*, 2002; Rodríguez-Carballo *et al.*, 2019).

Se demostró con el tiempo que la AER funciona como un centro de señalización indispensable para el desarrollo del primordio y sus funciones son: mantener el mesénquima distal en un estado proliferativo e indiferenciado que permita el correcto crecimiento y especificación del eje próximo-distal; mantener la expresión de moléculas para el establecimiento del eje antero-posterior; y también permitir la

interacción de moléculas necesarias para establecer el eje dorso-ventral con los demás ejes (Gilbert y Garresi, 2016).

Un descubrimiento crucial fue que los factores de crecimiento y la señalización celular regulan la comunicación AER-mesénquima. Cuando las células de la extremidad se cultivan, la proliferación aumenta con la presencia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; Aono *et al.*, 1988). Se observa que *Fgf4* se expresa en la región posterior de la AER, así cuando la cresta es retirada y se coloca una perla embebida con la proteína FGF4 en dicha región, se mantiene la formación de estructuras esqueléticas distales (Niswander *et al.*, 1994). De la misma manera, otros miembros de la familia de los FGFs pueden realizar la función de la AER. Si se coloca FGF1, FGF2 o FGF4 en la placa lateral se puede obtener la formación de primordios y extremidades ectópicas (Cohn *et al.*, 1995).

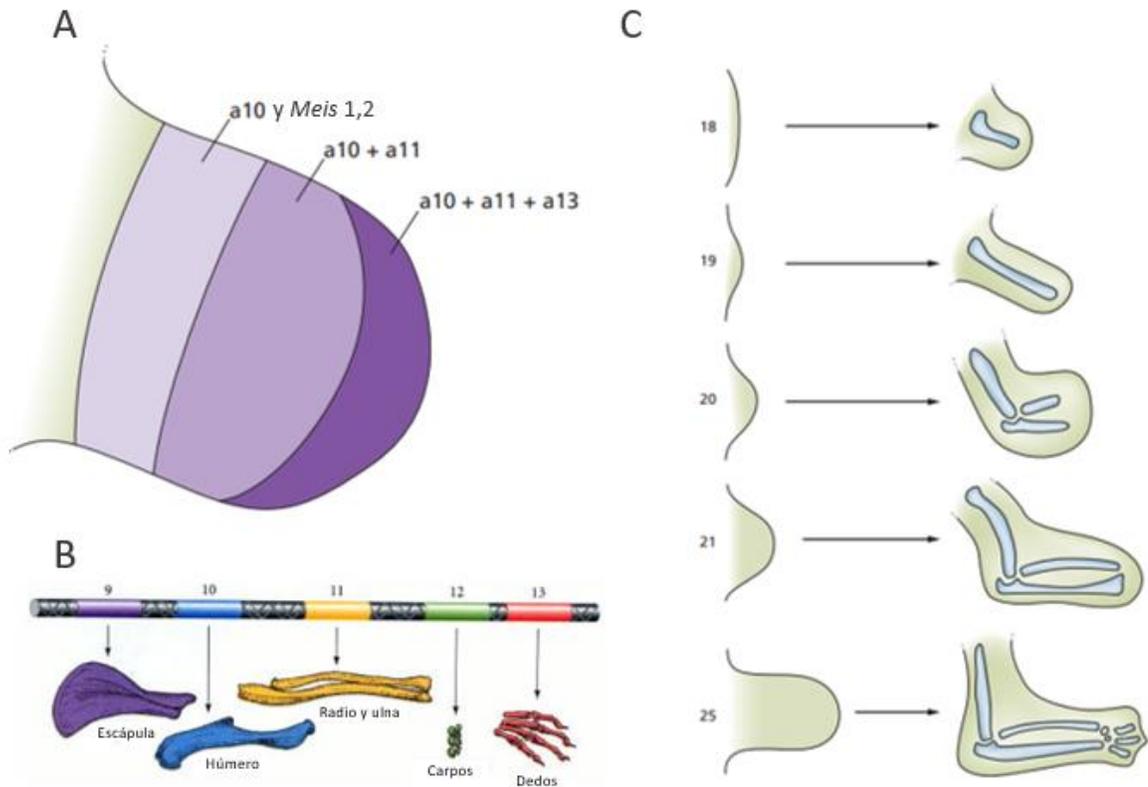
Cuando se muta *Fgf4/Fgf8* se trunca por completo la extremidad (Crossley *et al.*, 1996), por lo que ambos genes son necesarios para la iniciación y mantenimiento del primordio. Por ejemplo, los embriones mutantes de *Fgf8* poseen elementos esqueléticos reducidos, pero aún se forma el primordio, solo que muere en pocos días. A diferencia de *Fgf4*, *Fgf8* se expresa en toda la AER y, además, en los estadios donde la cresta entra en regresión (en etapa 30 en interdígito y en 36 para la punta del dedo) se reduce la expresión de *Fgf8*. De hecho, si la señalización es bloqueada colocando una perla embebida con el inhibidor de FGF en la región distal, se detiene por completo la formación de los dedos (Montero *et al.*, 2001).

Los descubrimientos a finales del siglo XX demostraron que la AER libera señales específicas para mantener el crecimiento de las extremidades, pero las células

que adquirirán la forma de la extremidad están en la región más distal del mesénquima (Rubin y Saunders, 1972; Figura 5A). Al buscar marcadores de proliferación celular se encontró en la región distal un rango de 300 micras entre el futuro cartílago y la AER. Estos datos llevaron a proponer el modelo de la zona de progreso, donde las células del mesénquima distal adquieren una información posicional dependiendo del tiempo al que estuvieron expuestas a las señales de la AER (Summerbell *et al.*, 1973), presumiblemente FGF8 (Crossley *et al.*, 1996).

A pesar de la propuesta anterior, una serie de observaciones llevaron a otros científicos a un planteamiento distinto. Se demostró que los segmentos esqueléticos próximo-distales expresaban genes en zonas delimitadas desde etapas tempranas de la formación del primordio. Por ejemplo: los genes *Meis 1* y *2* se observan expresados solo en la parte proximal del primordio, previo a la formación del estilópodo (Capdevila *et al.*, 1999); *Hoxa11* está presente en la región intermedia del primordio antes de la diferenciación a cartílago, donde se formará el zeugópodo, mientras *Hoxa13* se expresa distalmente, donde se formará el autópedo (Yokouchi *et al.*, 1991; Figura 5B y Figura 5C). *Hoxa*, *Hoxd* y *Meis* no solo están presentes previo a la formación del elemento esquelético, son necesarios para su propio desarrollo (Zakany y Duboule, 2007). Además, cuando se retira la AER, se inicia un proceso de muerte celular en una distancia no mayor a 200 micras de la AER (Dudley *et al.*, 2002). Si las células ya están comprometidas a formar una región de la extremidad y la AER es retirada, solo se formarán los segmentos especificados y proximales a la zona de 200 micras. Si se retira la AER en etapa muy temprana no se desarrolla el esqueleto, si está más avanzada solo se forma el estilópodo, si avanza un poco más se forma el

zeugópodo, etc. Este modelo se denominó de especificación temprana, debido a que todos los elementos poseen una información posicional antes de la evidencia morfológica del esqueleto apendicular.



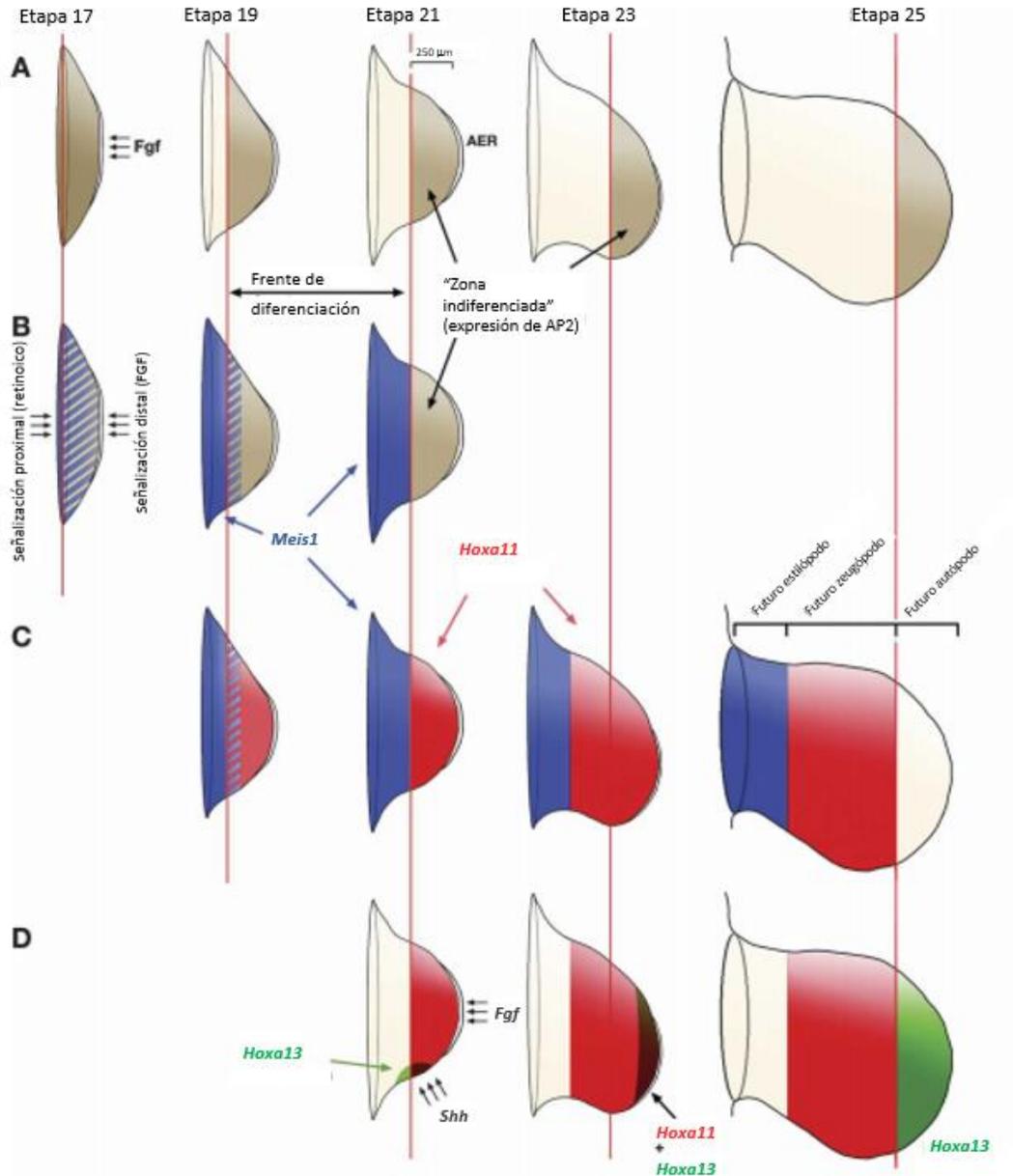
**Figura 5.** Control de la formación de elementos esqueléticos durante la formación del primordio. (A) Patrones de expresión de *Hoxa* y *Meis* en el primordio de la extremidad (B) Organización de los genes *Hoxa* en el cromosoma comparado con su expresión en el esqueleto adulto (C). Etapa en donde se retira la AER en el primordio de la extremidad y la morfología resultante. (Modificada de Gilbert, 2003 y de Slack, 2013).

Al comparar ambos modelos se encontraron errores en ambos, pero también se hicieron nuevos descubrimientos que permitieron explicar la formación del eje próximo-distal (Tabin y Wolpert, 2007). Por un lado, si el modelo de la zona de progreso es verdadero, las células del mesénquima distal solo necesitan un reloj interno para determinar su posición. Esta afirmación es incorrecta, las células

responden a señales inductivas de la AER de una forma dependiente de la concentración, y pueden cambiar su destino en respuesta a FGF, aún en ausencia de la AER (Sun *et al.*, 2002; ten Berge *et al.*, 2008). En caso de que la especificación temprana fuera cierta, se observaría la expresión de bandas de genes *Hox* desde las etapas más tempranas y su patrón de expresión no podría ser alterado por señales extracelulares. Se ha demostrado que *Meis* y *Hoxa* tienen un patrón dinámico de expresión, y no inician como bandas delgadas. Primero se expresa *Meis*, posteriormente se expresa *Hoxa11* y *Hoxa13* inicia como una pequeña área en la zona posterior, después se expresa en la misma zona de *Hoxa11* y va, poco a poco, extendiéndose a la zona distal hasta la etapa 25 (Tabin y Wolpert, 2007; Figura 6A).

En busca de un nuevo modelo para determinar la formación del eje próximo-distal se definió al mesénquima distal como la zona indiferenciada (Figura 6B), la cual responde a señales de diferentes centros de señalización para establecer temporalmente a los genes *Meis*, *Hoxa11* y *Hoxa13*, para así especificar a los elementos esqueléticos. *Meis1* y *Meis2* son directamente activados por altos niveles de ácido retinoico proveniente del eje corporal. Cuando el primordio se encuentra en etapa 17, *Meis1* y *Meis2* están presentes en todo el primordio, aún menor de 250 micras de largo, pero cuando se sigue proliferando la región distal se inhibe *Meis* en la zona indiferenciada por acción de FGF (Figura 6B). En la etapa 19, se inicia la expresión de *Hoxa11* en la zona indiferenciada y se entremezcla en un área intermedia con *Meis*, zona definida como frente de diferenciación, para la etapa 21 tanto *Meis* como *Hoxa11* se expresan en áreas distintas (Figura 6C). *Hoxa13* inicia su expresión en la etapa 21, en un área muy

pequeña de la zona posterior de la extremidad, donde se expresa *Shh*. Al avanzar a etapa 23, *Hoxa13* cambia su área a la región distal del primordio, aunque en un área más reducida a la zona indiferenciada y mezclada con *Hoxa11*. Al llegar a etapa 25, *Hoxa13* está solo en la zona indiferenciada (Figura 6D).



**Figura 6.** Modelo actual de la formación del eje próximo-distal en el primordio de la extremidad. (A) Desarrollo de la extremidad entre etapa 17 a 25 mostrando en gris la zona indiferenciada. (B) Patrón de expresión de *Meis1* (azul) y momento donde se mezcla con la zona indiferenciada (diagonales) (C) Patrón de expresión de *Hoxa11* (rojo) entre la etapa 19 a 25. (D) Patrón de expresión de *Hoxa13* entre etapa 21 a 25, en negro cuando está mezclado con *Hoxa11* y en verde cuando está aislado (Modificada de Tabin y Wolpert, 2007).

Al momento de extirpar la AER, genes específicos de la zona indiferenciada como son *Ap2*, *Msx1* o *Sprouty* son inhibidos en la región distal, a las pocas horas de la intervención. Al mismo tiempo, la pérdida de la AER induce un área de muerte celular de 200µm de grosor, correspondiente a la zona indiferenciada (Dudley *et al.*, 2002). Estos efectos son bloqueados si se implanta en la región distal perlas con FGF2 (Fallon *et al.*, 1994). Por este motivo se ha manejado que las proteínas FGF actúan como un factor de supervivencia (Tabin y Wolpert, 2007) pero también se ha demostrado que la implantación de perlas embebidas en FGF8 aceleran la muerte en el interdígito (Montero *et al.*, 2001), por lo cual se sugiere un balance en los niveles de los *Fgf* en la AER para mantener la proliferación, pero evitar la muerte celular.

Para mantener la proliferación celular, la AER también produce, además de FGFs, señales WNT que dan una retroalimentación positiva para el establecimiento de la AER (ten Berge *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, ambas señales bloquean la diferenciación en una masa de tejido mesenquimal entre 200 a 300µm adyacente a la AER, conocida como la zona indiferenciada (Tabin y Wolpert, 2007).

La combinación de WNT3A y FGF8 en cultivo bloquea por completo la diferenciación a cartílago, pero la expresión de *Wnt3a* está presente en todo el ectodermo, mientras la expresión de *Fgf8* solo se restringe a la AER. Ambas

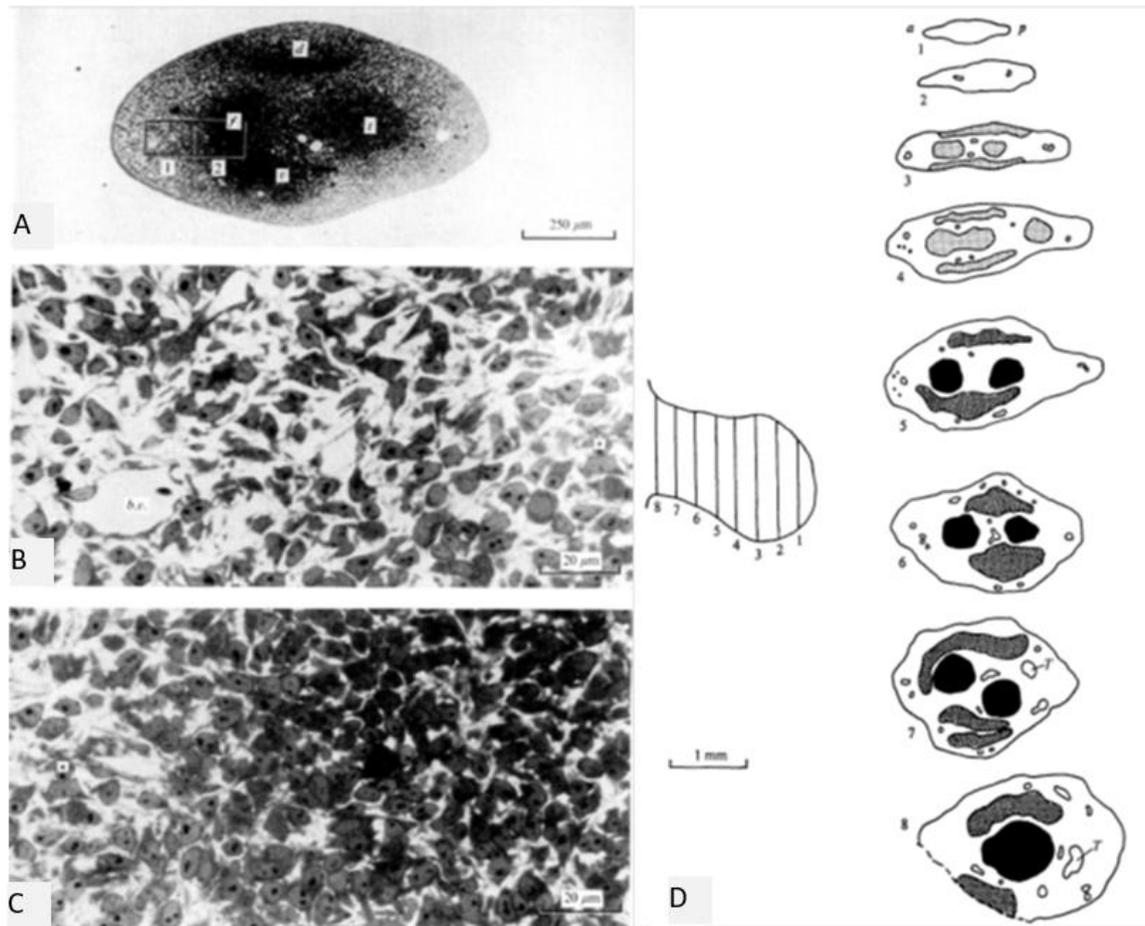
moléculas fomentan la expresión de los genes marcadores de la zona indiferenciada como son *Msx1*, *Axin2*, o *Nmyc*, o *Wnt5a* (Yamaguchi *et al.* 1999; ten Berge *et al.*, 2008). *Fgf8* es capaz de retrasar la diferenciación a cartílago (ten Berge *et al.*, 2008), pero la inhibición de la señalización FGF con SU5402 reduce el tamaño de los dedos (Montero *et al.*, 2001), indicando que es necesaria para la condrogénesis. Estos datos sugieren una regulación constante de la AER para el crecimiento, supervivencia, control de la diferenciación y especificación de estructuras en el primordio de la extremidad. Pero la apoptosis y la condrogénesis son reguladas en la zona indiferenciada por la AER, aún se desconoce qué mecanismos dan la transición en el frente de diferenciación para iniciar la condrogénesis en el desarrollo de extremidades. Por lo cual, es importante conocer en detalle el proceso de la condrogénesis durante la morfogénesis del esqueleto apendicular.

### *Diferenciación a cartílago*

El primordio de la extremidad de etapa temprana está compuesto de una masa de células mesenquimales con filopodios, confiriéndoles una apariencia estrellada con amplio espacio intercelular y vascularización (Farquhar, 1963; Searls *et al.*, 1972). Al salir de la zona indiferenciada y de las señales ectodérmicas, las células inician la diferenciación hacia cartílago. Se pierden los filopodios y el espacio intercelular hasta quedar estrechamente unidas formando una condensación precondrogénica, ésta es la primera evidencia morfológica del esqueleto apendicular. Durante este proceso los vasos sanguíneos se pierden por lo que

este tejido tendrá poca oxigenación. Como se puede observar en la Figura 7 el patrón de condensación y diferenciación va en relación con el eje próximo-distal, iniciando en la parte proximal y avanzando hacia la región distal (Thorogood y Hinchliffe, 1975).

Las moléculas marcadoras del cartílago en diferenciación están claramente identificadas. El ácido hialurónico (HA) facilita la agregación celular en etapas tempranas del primordio (Maleski *et al.*, 1996) y disminuye con la producción de Hialuronidasa (degradador del HA) y condroitina sulfato, un tipo de glicosaminoglicanos que se secretan previo a la condensación de cartílago (Searls, 1965; Kosher *et al.*, 1981; Kulyk *et al.*, 1989). Estos glicosaminoglicanos sulfatados son fácilmente identificables con la tinción de azul Alciano (Figura 8A). A su vez, las proteínas de adhesión celular, entre ellas N-Cadherina, son importantes para una completa condensación (Delise y Tuan, 2002).



**Figura 7.** La condensación celular sigue un patrón próximo-distal. (A) Corte transversal en la región del zeugópodo de estadio 26, el pequeño recuadro a la izquierda indica un acercamiento visto en (B) donde el espacio intercelular mesénquima es mayor y el recuadro de la derecha corresponde a un acercamiento visto en (C) donde hay una condensación precondrogénica. En (D) se esquematizan varios cortes transversales en el mismo estadio donde se observa que la condensación es inicial hacia la región distal. A mayor tonalidad de gris corresponde al grado de condensación, lo que está dorsal y ventral del centro son paquetes musculares. (Modificada de Thorgood y Hinchliffe, 1975).

*La cascada molecular de la condrogénesis.*

Después de la condensación, la expresión de proteínas de matriz extracelular cambia. Los centros de condensación sustituyen a la colágena I por la colágena II, restringiendo la colágena I a las células aplanadas que rodean el blastema

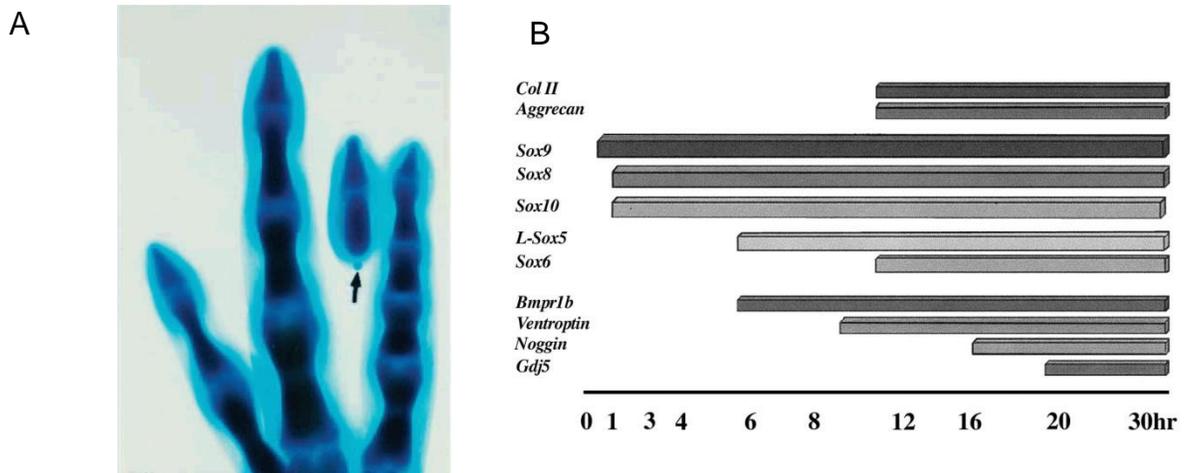
cartilaginoso, denominado pericondrio (Von der Mark *et al.*, 1976). Aunque la colágena I y la fibronectina persisten en los elementos esqueléticos, siempre permanecen en la periferia, tanto en el pericondrio como en la mesénquima adyacente (Dessau *et al.*, 1980; Kulyk *et al.*, 1989).

El factor de transcripción SOX9 es esencial en la formación de cartílago y la expresión genética de todas las proteínas mencionadas en el proceso de diferenciación. *Sox9* se identificó en la displasia campomélica, enfermedad congénita del esqueleto. Los individuos con mutación en *Sox9* presentan acortamiento de las extremidades, escápula e ilion pequeños, huesos largos curvados, orejas pequeñas y nariz aplanada (Akiyama *et al.*, 2002). Uno de los genes blanco de SOX9 es la *colágena II* y su expresión se localiza en las mismas zonas donde *colágena II* se expresará en el esqueleto, posterior a la condensación (Lefebvre *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997). Si la expresión de *Sox9* se inhibe en el mesénquima de la extremidad, no se forman los elementos cartilagosos. El primordio inicia su formación de manera normal, expresando factores como *Fgf8* y otros marcadores importantes en la formación de la extremidad. Se observa que las células del primordio, al no diferenciarse a cartílago, entran en apoptosis y las extremidades dejan de crecer, e incluso reducen su tamaño (Akiyama *et al.*, 2002). La activación de SOX9, en conjunto con SOX5 y SOX6 en el núcleo, es muy importante para iniciar la diferenciación a cartílago y sobre todo para producir la matriz extracelular. La doble mutación de *Sox5* y *Sox6* en ratón posee las condensaciones precondrogénicas pero no se expresan *colágena II* ni los glucosaminoglicanos propios del cartílago (Smits *et al.*, 2001).

La segunda función notable de SOX9, para iniciar el proceso de diferenciación celular a cartílago, es a través del bloqueo de la señalización WNT/ $\beta$ -catenina. Tanto  $\beta$ -catenina como SOX9 pueden unirse en el núcleo de la célula, en la región carboxilo terminal de la proteína SOX9 y en la proteína  $\beta$ -catenina en su dominio Armadillo (Akiyama *et al.*, 2004). Una vez unidas, la región carboxilo terminal de SOX9 inhibe la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina, al reducir la expresión de genes de proliferación como *Ciclina D1*. Además de la inhibición de actividad, también SOX9 recluta a GSK3 $\beta$  y CK1 $\alpha$  en el núcleo para fosforilar a  $\beta$ -catenina y llevarlo a su degradación (Topol *et al.*, 2008).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) es relevante en el inicio de la condrogénesis a nivel embrionario a través de la regulación de *Sox9*. Los miembros TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en cultivos *in vitro* de micromasas de células de la extremidad en desarrollo (condiciones de cultivo en alta densidad que promueven la condensación celular) favorecen la producción de glucosaminoglicanos de la matriz de cartílago. Esta inducción aumenta de 3 hasta 6 veces más la producción de mRNA de *colágena II*. Además, provocan la diferenciación de cartílago en células cultivadas en baja densidad, lo cual no sucede de manera normal en esas condiciones (Kulyk *et al.*, 1989). En la extremidad, TGF $\beta$  actúa como un inductor de la condrogénesis. La aplicación de una perla de heparina embebida con la proteína TGF $\beta$  en el tercer interdígito de etapa 28 es capaz de cambiar el destino celular del tejido. El resultado es la formación de cartílago, desarrollándose como un dedo ectópico (Gañan *et al.*, 1996; Figura 8A). Entre los distintos genes relacionados con la condrogénesis, *Sox9* es el factor que se expresa más

temprano, al inducirse a los 30min. A partir de este momento se lleva a cabo una cascada molecular en la que se inducen temporalmente otros genes condrogénicos. La temporalidad de expresión de estos genes es importante para conocer la regulación del proceso condrogénico. Otros miembros de la familia SOX como *Sox8*, *Sox10*, *Sox5* y *Sox6* son los primeros en inducirse en las primeras horas. Posteriormente, se expresa *Bmpr1b* poco antes del receptor WNT, *Fz4* (Chimal-Monroy *et al.*, 2002; Chimal-Monroy *et al.*, 2003; Figura 8B). Por último, se inducen moléculas de la matriz extracelular como *colágena II* y *agrecano*, junto al antagonista de BMP *Noggin* (Chimal-Monroy *et al.*, 2003).



**Figura 8.** La aplicación de  $TGF\beta$  en el interdígito dispara una cascada molecular involucrada en Condrogénesis y la formación de los elementos esqueléticos. En (A) se muestra la formación del dedo ectópico en una tinción de azul alciano (específica para el cartílago). En (B) se muestra el inicio de la expresión de moléculas que participan en etapas tempranas en la formación del esqueleto del dedo ectópico (modificada de Gañan *et al.*, 1996 y la gráfica fue tomada de Chimal-Monroy *et al.*, 2003).

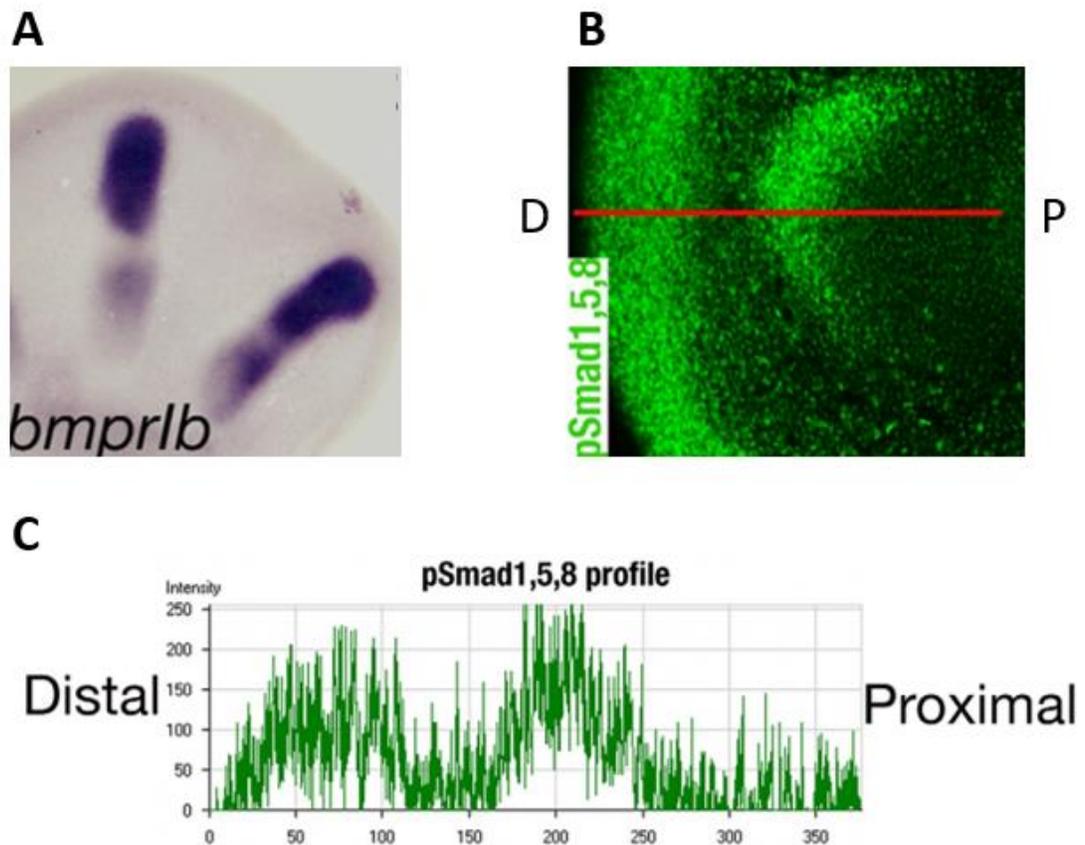
Otro grupo de la familia  $TGF\beta$ , la subfamilia de BMP y sus antagonistas participan en la formación del cartílago. La mutación en *Bmp5* está asociada a defectos en el

esqueleto incluyendo la reducción en el tamaño de los huesos largos (King *et al.*, 1994). La colocación de perlas de BMP7 en la punta del dedo induce cartílago de forma excesiva (Gañan *et al.*, 1996). Mientras, el receptor por el cual actúan las BMPs en la condensación condrogénica es BMPR1b y su sobreexpresión genera elementos gruesos. En cultivo de micromasas, la construcción dominante negativa de *Bmpr1b* da como resultado la inhibición de la formación del cartílago (Zou *et al.*, 1997). En la formación del dedo ectópico *Bmpr1b* se observa previo a la expresión de *colágena II* (Chimal-Monroy *et al.*, 2003), de manera normal *Bmpr1b* se expresa en los dedos (Figura 9A).

La región más distal de los dígitos en el embrión tiene una actividad constante de condensación a partir de las células provenientes de la zona indiferenciada. A este grupo de células se le ha nombrado creciente digital o región formadora de falanges (DC/PFR; Montero *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008). En la DC/PFR hay una actividad constante de señalización por parte de TGF $\beta$  y BMP marcada por la fosforilación de SMAD (Figura 9B y Figura 9C), y también aumenta la expresión de los genes más tempranos de la cascada molecular de la condrogénesis.

El antagonista de BMP, *Noggin*, se expresa en las condensaciones por lo que puede formar un asa de retroalimentación con BMP controlando el tamaño de los dígitos (Merino *et al.*, 1998). El mutante nulo para *Noggin* genera extremidades engrosadas y de menor tamaño (Brunet *et al.*, 1998) y en células transfectadas con *Noggin* no se forma cartílago ni se da la expresión de *Sox9* (Pizette y Niswander, 2000). Si se colocan perlas embebidas con la proteína *Noggin* en la punta del dedo, se trunca su crecimiento, induciendo la muerte celular en tejido

distal (Merino *et al.*, 1998). A su vez, la mutación de *Sox9* no afecta los genes tempranos del primordio, pero la ausencia de condrogénesis lleva a la muerte celular masiva (Akiyama *et al.*, 2002), así como implantar perlas con ácido retinoico. En cambio, la implantación de perlas con  $TGF\beta$  inhiben la muerte interdigital a la par de inducir condrogénesis. En contraste con los datos previos, la sobreexpresión de WNT canónico en la extremidad no induce apoptosis, a pesar de perder el esqueleto (Hill *et al.*, 2006), por tal motivo es importante conocer la regulación de la muerte celular en relación con la formación de cartílago a través de diferentes vías de señalización.



**Figura 9.** La Creciente digital es una zona de alta actividad en señalización de TGF $\beta$ . En (A) se muestra la expresión de *Bmpr1b*. En (B) se muestra en verde la presencia de las proteínas SMAD 1,5 Y 8 fosforiladas (marca de señalización celular activa para TGF $\beta$ ). Se puede notar que la señalización es incluso más distal que las células condensadas, mostrando las células reclutadas hacia el linaje condrogénico. En (C) se muestra la cantidad de marca fluorescente para la señalización de TGF $\beta$  desde la región más distal hasta la zona proximal del cartílago digital (modificada de Montero *et al.*, 2008).

*Muerte celular en la extremidad y su control por BMP.*

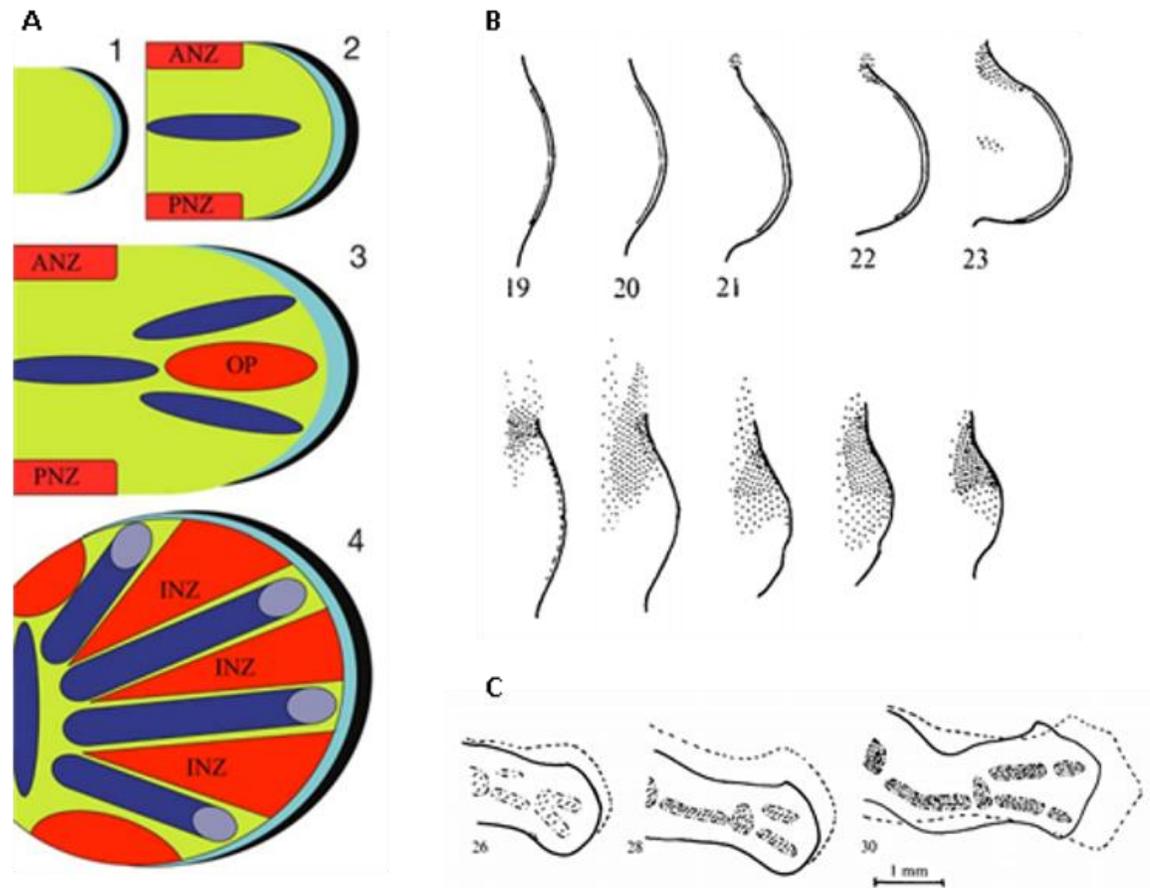
Aunque el esqueleto y la musculatura son los tejidos más abundantes en la extremidad adulta, la muerte celular programada es un proceso de importancia en la adquisición de la morfología a nivel embrionario (Hinchliffe y Ede, 1973; Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2007). Este proceso es controlado por un mecanismo

molecular coordinado por enzimas para degradar proteínas de la lámina nuclear y del citoesqueleto, condensar la cromatina y fragmentar los cromosomas. Estos eventos acaban con la fragmentación de la célula en distintas vesículas pequeñas (o cuerpos apoptóticos), lo que provoca la muerte celular. Así se permite a los fagocitos ingerir las vesículas sin provocar daños en el microambiente extracelular ni inducir inflamación que pueda afectar al resto del tejido, como ocurre en la necrosis (Montero y Hurlé, 2010). La activación de la apoptosis se induce por dos vías: la vía intrínseca (mediada por BCL2, BAX o BAK) y la extrínseca, mediada por los receptores transmembranales de muerte y la activación de Caspasa 8 (Chimal-Monroy *et al.*, 2011). Debido a que ambas vías deben ser inhibidas para bloquear la muerte celular se cree que hay cooperación de ambas vías para que se lleve a cabo la apoptosis.

En la formación y elongación del primordio de la extremidad en aves se han identificado zonas de muerte celular inicialmente denominadas Zonas Necróticas (Saunders 1962), las cuales ayudan a moldear el contorno de la extremidad. Asimismo, la muerte celular contribuye a segmentar los elementos esqueléticos de cartílago y formar las articulaciones (Fell y Canti, 1934). Con el tiempo se ha demostrado que la principal forma de muerte celular es la apoptosis, y no se ha observado necrosis, por lo cual se ha cambiado el término de zonas Necróticas a zonas Apoptóticas (Fernández- Terán *et al.*, 2006; Abarca-Buis *et al.*, 2011).

Las 5 zonas apoptóticas en la extremidad son: La zona apoptótica anterior (AAZ), la zona apoptótica posterior (PAZ), el parche opaco entre los elementos del zeugópodo, las zonas apoptóticas interdigitales (IAZs) y mesénquima localizado por debajo de la AER (Saunders, 1962; Montero y Hurlé, 2010; Abarca-Buis *et al.*,

2011; Figura 10A). La cantidad de células necesarias para dar proporción y tamaño de los elementos esqueléticos debe ser regulada, por lo que la muerte celular controla el número de la población (Hinchliffe y Ede, 1973; Macías *et al.*, 1997). También, las zonas apoptóticas coinciden en su límite distal con los bordes de la AER y en fenotipos mutantes como *Wingless* se expande la zona de muerte en la AAZ y se reduce la AER dando como resultado la pérdida del radio y el dedo II (Hinchliffe y Ede, 1973; Figura 10B y Figura 10C). Aunque la IAZ no será utilizada en la vida adulta funcionan como centro de comunicación celular necesarios para la morfogénesis. El tejido interdigital secreta factores de crecimiento como BMP, antagonistas de las WNT y sintetiza ácido retinoico que controlan la identidad digital y regulan la diferenciación a cartílago (Montero y Hurle, 2010).



**Figura 10** (A) Esquemas que ejemplifican las zonas de muerte celular en la extremidad embrionaria. En la primera imagen se observa un primordio muy temprano y no presenta zonas de muerte. En el segundo se ha proyectado la extremidad y ha iniciado la formación del estilópodo. Se aprecia dos áreas de muerte la AAZ/ANZ y la PAZ/PNZ. En la tercera imagen se ha iniciado la morfogénesis del zeugópodo y surge una nueva zona de muerte celular, el parche opaco (OP) entre los dos elementos cartilagosos. Finalmente, el cuarto esquema presenta la formación del autótopodo donde se aprecian los dígitos de forma radial y entre ellos las zonas rojas de muerte interdigital IAZ/INZ. En azul claro se marca la zona indiferenciada y en azul oscuro el esqueleto cartilaginoso. (B) Áreas de muerte celular en la zona posterior de embriones normales (arriba) y del mutante *Wingless* (abajo). (C) Cambios en el esqueleto del mutante *Wingless* entre la etapa 26 a la 30. El contorno punteado representa una extremidad embrionaria normal de la misma etapa. (modificada de Hinchliffe *et al.*, 1973 y de Montero *et al.*, 2010).

Los factores de crecimiento BMPs son reguladores del proceso apoptótico en la extremidad. Los genes *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* y *Bmp7* se expresan en las zonas

apoptóticas incluso antes de iniciar el proceso de muerte (Francis *et al.*, 1994; Zou y Niswander, 1996; Zuzarte-Luis *et al.*, 2004). Si se colocan perlas con proteínas BMP en la zona indiferenciada del interdígito se acelera la apoptosis obteniendo una regresión interdigital temprana. Si se coloca en la zona indiferenciada durante etapas muy tempranas del primordio se puede llegar a truncar por completo la formación de la extremidad (Gañan *et al.*, 1996; Macías *et al.*, 1997; Zuzarte-Luis *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2008). Tomando en cuenta los fenotipos de *Wingless*, donde el aumento de células muertas genera un ala con elementos esqueléticos ausentes, si se coloca una perla con BMP5 en la AAZ de embriones normales se puede ver un aumento muy similar en la apoptosis y el esqueleto (Macías *et al.*, 1997; Figura 11A). Este proceso está regulado en parte por SMAD8, el cual induce su expresión genética si se colocan perlas de BMP7 en la AAZ, incrementando la apoptosis (Abarca-Buis *et al.*, 2011; Figura 11B).



**Figura 11.** La señalización BMP7/SMAD regula la muerte celular en la AAZ, necesario para la formación normal del esqueleto. Extremidades tratadas con BMP5 después de 2 días de incubación teñidas para rojo neutro (izquierda) y después de 4 días teñidos para esqueleto (derecha). Se puede notar la inducción de muerte masiva provocada por la perla (asterisco) y el fenotipo de esqueleto igual al de la Figura 5C (flecha). (B) Tinción de rojo neutro e hibridación de Smad8 después de un tratamiento con perlas de BMP7. A diferencia de un primordio normal (izquierda) se acelera una amplia área de muerte celular (Flecha) y un aumento en la expresión de Smad8 en la AAZ. (modificada de Macías *et al.*, 1997 y de Abraca-Buis, 2011).

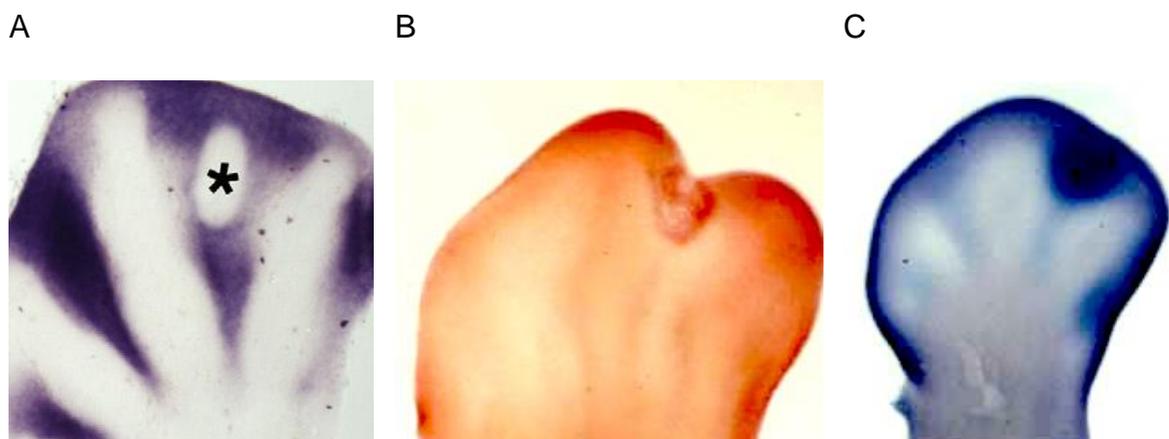
Las proteínas BMP producen efectos muy diferentes una vez que se ha iniciado el compromiso celular hacia la diferenciación a cartílago. Cuando se colocan las perlas con las mismas proteínas BMP en la región distal de los dedos, estos aumentan su grosor y pierden la articulación (Macías *et al.*, 1997; Chimal-Monroy

*et al.*, 2003). Por estas diferencias en la respuesta celular a BMP, se ha explorado como se expresan sus receptores y proteínas de la señalización en la extremidad embrionaria. Se ha encontrado el RNA mensajero de *Bmpr1a* en el mesénquima indiferenciado e interdígitos mientras que *Bmpr1b* se concentra en los moldes de cartílago (Montero *et al.*, 2008). En inmunohistoquímicas de las proteínas SMAD 1,5 Y 8 fosforiladas, activadas en la señalización BMP, se encuentran tanto en el interdígito como en la punta de los dedos, por lo que se puede concluir que esta vía participa tanto en apoptosis, como en condrogénesis, dependiendo el estado de diferenciación y el compromiso celular en la zona indiferenciada.

Como se explicó anteriormente, las vías de señalización BMP y TGF $\beta$  son inhibidas por distintas proteínas a nivel extracelular (Noggin y Gremlin), en la membrana celular (BAMBI) y a nivel intracelular (SMAD6, SMAD7 y SMURF). A diferencia de los genes *Bmp*, los inhibidores se expresan en distintas zonas de la extremidad. De todos ellos, de particular interés es BAMBI, una forma inactiva del receptor BMPR1B, el cual compite con la dimerización de los correceptores, bloqueando la señalización BMP/TGF $\beta$ /Activina (Onichtchouk *et al.*, 1999). *Bambi* restringe su área de expresión en el autópodo a las IAZs (Grotewold *et al.*, 2001) en la etapa 27 y va reduciendo su expresión en las zonas donde ya inició la apoptosis a partir de la etapa 30.

Se puede cambiar la identidad del interdígito aumentando los niveles de TGF $\beta$  en el borde de la zona indiferenciada. Horas después de colocar perlas con TGF $\beta$  se inhibe la expresión de *Bambi* y *Bmps*, favoreciendo la formación de cartílago (Chimal-Monroy *et al.*, 2002; Chimal-Monroy *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2008). En

contraste, si se coloca una perla de BMP5 en el interdígito se incrementa la expresión de *Bambi* previo a un incremento de la apoptosis en el interdígito (Zuzarte-Luis *et al.*, 2004; Figura 12). Tomando en cuenta estos antecedentes se sugiere al mecanismo de acción de BMPs dependiente del estado de diferenciación celular. Si el tejido se mantiene indiferenciado, las BMPs favorecen el inicio de la apoptosis, si las células ya están comprometidas al linaje condrogénico hay un recambio de receptores y la misma señalización favorece la diferenciación a cartílago. En contraste, TGF $\beta$  es capaz de alterar el destino de las células inhibiendo la muerte celular y comprometiéndolas para diferenciarse a condrocitos.



**Figura 12** (A) Inhibición de la expresión de *Bambi* en la zona interdigital después de un tratamiento por 24h con TGF $\beta$  (B,C) Tinción de rojo neutro e hibridación para *Bambi* después de un tratamiento con perlas de BMP5 en el tercer interdígito. En contraste a TGF $\beta$ , *Bambi* es sobre expresado en el interdígito después de aplicar BMP y se incrementa la muerte celular. (modificada de Montero *et al.*, 2008 y de Zuzarte-Luis, 2004).

## La señalización WNT en el desarrollo de la extremidad

### *Inhibición de la condrogénesis por la señalización WNT/ $\beta$ -catenina.*

Está demostrado que el ectodermo genera una inhibición de la condrogénesis en células indiferenciadas del primordio de la extremidad, aunque sean cultivadas en alta densidad (Solursh *et al.*, 1981). Al extirpar la AER se reduce rápidamente la actividad de  $\beta$ -catenina y sus genes blanco en la zona indiferenciada, en contraste, la aplicación de WNT3A en el centro de primordio incrementa la actividad de  $\beta$ -catenina e inhibe la diferenciación a cartílago (ten Berge *et al.*, 2008). *Wnt3a* se expresa en la AER e induce la expresión de *Fgf8* a través de la señalización WNT/ $\beta$ -catenina para promover la proliferación. Además, la sobreexpresión de  *$\beta$ -catenina* reduce la expresión de *Sox9* y *colágena II*, incrementa la expresión de *Wnt3a* y activa la misma señalización por  $\beta$ -catenina (Hartmann y Tabin, 2001; ten Berge *et al.*, 2008). En células en cultivo, la sobreexpresión de los genes *WNT4* y *WNT9* mantiene la formación de condensaciones, pero se inhibe la formación de matriz extracelular del cartílago, aunque no se sabe si hay cambios en la expresión de los genes más tempranos de la cascada condrogénica, como cambios en *Sox5* o *Sox6* (Zhao *et al.*, 1997; Chimal-Monroy *et al.*, 2003)

Para el correcto desarrollo del primordio, el balance de la señalización WNT/ $\beta$ -catenina es regulado extracelularmente por los antagonistas WNT (DKK, SFRP,

WISP y WIF), factores de crecimiento como la familia TGF $\beta$  e incluso otros miembros de la familia WNT, como es el caso de WNT5A (Witte *et al.*, 2010). El papel de DKK1 está relacionado tanto con la condrogénesis como con la muerte celular, la mutación de *Dkk1* en ratones produce polidactilia (formación de dedos extra) o la sindactilia (fusión de los dedos en la piel o los huesos de las falanges) por la inhibición de la apoptosis en el interdígito. Además, su sobreexpresión induce mayores niveles de *Fgf8* e inhibe a *Bmp2* llevando a la reducción y posterior pérdida de elementos esqueléticos (Grotewold *et al.*, 1999; Mukhopadhyay *et al.*, 2001). Estos resultados contribuyen a la explicación de que FGF es controlado por WNT por la vía canónica.

En el caso de los antagonistas generales de WNT, los SFRP, su mecanismo de acción es menos claro. La mutación de los genes *Sfrps* incrementa la actividad de  $\beta$ -catenina y genera braquidactilia (la reducción en el largo de las falanges), pero su inhibición incrementa la formación de nódulos de cartílago, por lo cual los efectos de este antagonista sugieren otros ligandos de la familia WNT como blanco (Gaur *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2006). Otro dato por considerar son los distintos patrones de expresión del antagonista *Dkk1* y de *Sfrp1*, el primero se expresa en la zona indiferenciada mientras el segundo está presente en el pericondrio, el interdígito adyacente a los dedos y cerca de la DC/PFR (Witte *et al.*, 2009)

Además de la regulación extracelular, a nivel intracelular también es importante el control de  $\beta$ -catenina. Cuando se inhibe la expresión de  $\beta$ -catenina en el

mesénquima, la diferenciación a cartílago se acelera, y da como resultado una morfogénesis alterada (Hill *et al.*, 2006). Como se mencionó, la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina es bloqueada por SOX9, y simultáneamente transporta a  $\beta$ -catenina fuera del núcleo para su degradación en el proteosoma (Topol *et al.*, 2009). También, WNT7A es capaz de incrementar las condensaciones celulares en cultivo a través de la regulación de N-cadherina y promoviendo la estabilización de  $\beta$ -catenina en el complejo de adhesión celular, manteniéndola alejada del núcleo (Hartmann y Tabin, 2000; Tufan *et al.*, 2001). Estos antecedentes concuerdan en que elevar los niveles de SOX9 en las células lleva a una reducción de la señalización  $\beta$ -catenina en zonas donde inicia la condrogénesis.

### **Las vías WNT/PCP y su participación en el desarrollo de la extremidad.**

De los miembros de la familia WNT, el ligando WNT5A está reportado como un activador de las vías no canónicas de WNT al formar complejos en la membrana celular con FZ, DVL y ROR2 (Groumolato *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011). Hasta ahora, el papel de WNT5A en el desarrollo del primordio de la extremidad está más relacionado con la señalización no canónica WNT/PCP. En etapas muy tempranas del crecimiento del primordio esta vía ayuda a guiar la división celular en las células distales, las dorsales y las ventrales, para promover la extensión coordinada de la estructura (Gros *et al.*, 2010).

En los elementos esqueléticos, la vía WNT/PCP, controla la orientación de la zona II de cartílagos en proliferación en respuesta a WNT5A. Durante la condensación precondrogénica las células están más desorganizadas y sin orientación. Mientras los condrocitos están madurando existe un gradiente de expresión de *Wnt5a* desde la zona indiferenciada hacia el dígito, controlando la morfología aplanada de los condrocitos en proliferación. La respuesta a WNT5A parece estar mediada por ROR2 y VANGL2, cuando ambos genes están mutados se presenta una desorganización de los condrocitos y una falta en la activación del factor de transcripción *c-jun* (Wang *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011).

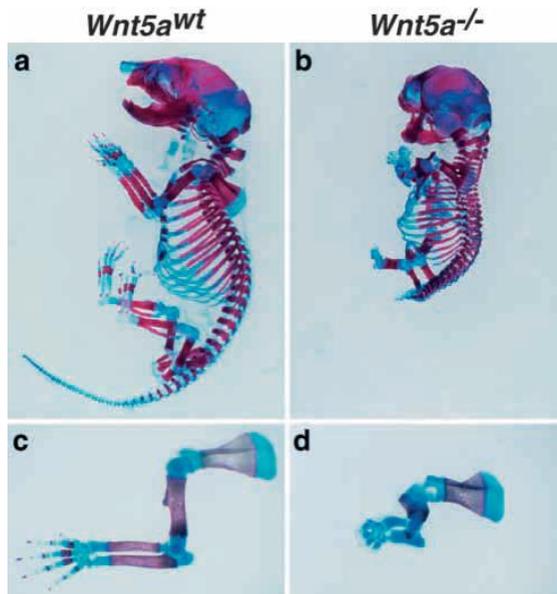
En relación con el papel de RHO en el desarrollo de la extremidad, la proteína RHOA inhibe la condrogénesis al reducir la expresión de *colágena II*, *agrecano*, *Sox5* y *Sox6*, modificando la actividad del citoesqueleto en la condensación precondrogénica (Woods y Beier, 2006). Además, cuando se induce la cascada molecular de la condrogénesis, *RhoA* y *RhoC* se expresan desde las 10 h, periodo en el cual se remodela el citoesqueleto para permitir la condensación (Lorda-Diez *et al.*, 2011). Por otro lado, la inhibición de *RhoC* fusiona el esqueleto y se pierden las articulaciones. En cultivo celular la sobreexpresión de este gen altera al complejo de membrana integrina/cinasa de adhesión focal/RHOA (Montero *et al.*, 2007).

A pesar de que se conocen efectos en el cartílago maduro, la zona de mayor concentración de *Wnt5a* es adyacente a la AER, por lo cual las células con mayor actividad de señalización no canónica corresponden a la zona indiferenciada y la creiente digital, momento clave en el compromiso celular de la diferenciación a cartílago.

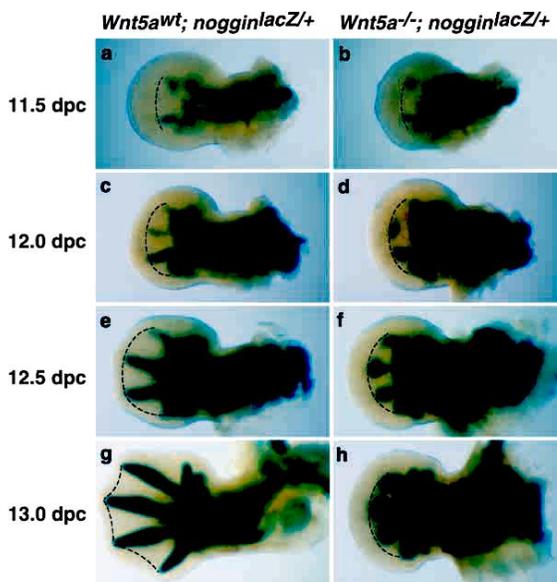
*La proteína WNT5A antagoniza a WNT/  $\beta$ -catenina en la zona indiferenciada.*

A pesar de que se conocen efectos de señalización WNT no canónica en el cartílago maduro, la expresión de *Wnt5a* en etapas tempranas del desarrollo está concentrada en la zona indiferenciada. El gen se expresa en un gradiente, reduciéndose hacia la región proximal. En etapas posteriores, la expresión se restringe a la punta de los dedos y la interzona (Dealy *et al.*, 1993; Kawakami *et al.*, 1999).

El síndrome Robinow está ligado a la mutación en *Wnt5a*, y se caracteriza por presentar extremidades reducidas o manos con dedos pequeños con ausencia de algunas articulaciones (Person *et al.*, 2010). Los ratones con mutación de *Wnt5a* muestran reducción de varias estructuras como la mandíbula, las orejas, la cola y las extremidades, las cuales necesitan crecer y extenderse durante el desarrollo (Figura 13). El principal fenotipo en las primeras etapas del desarrollo de la extremidad es una zona indiferenciada más amplia que en embriones normales, esto sugiere que su origen es una deficiencia en el reclutamiento de células hacia el linaje condrogénico (Yamaguchi *et al.*, 1999; Figura 14). En la Figura 14 también se puede ver una línea punteada que marca el límite distal del dedo y se aprecia cómo el contorno de la extremidad cambia en distancia durante el día 13 de desarrollo entre ratones mutantes y normales. Por este motivo, además de la participación de WNT5A en la maduración del cartílago se ha propuesto que tiene otro papel importante en el control del crecimiento y la diferenciación a cartílago en el primordio de la extremidad.



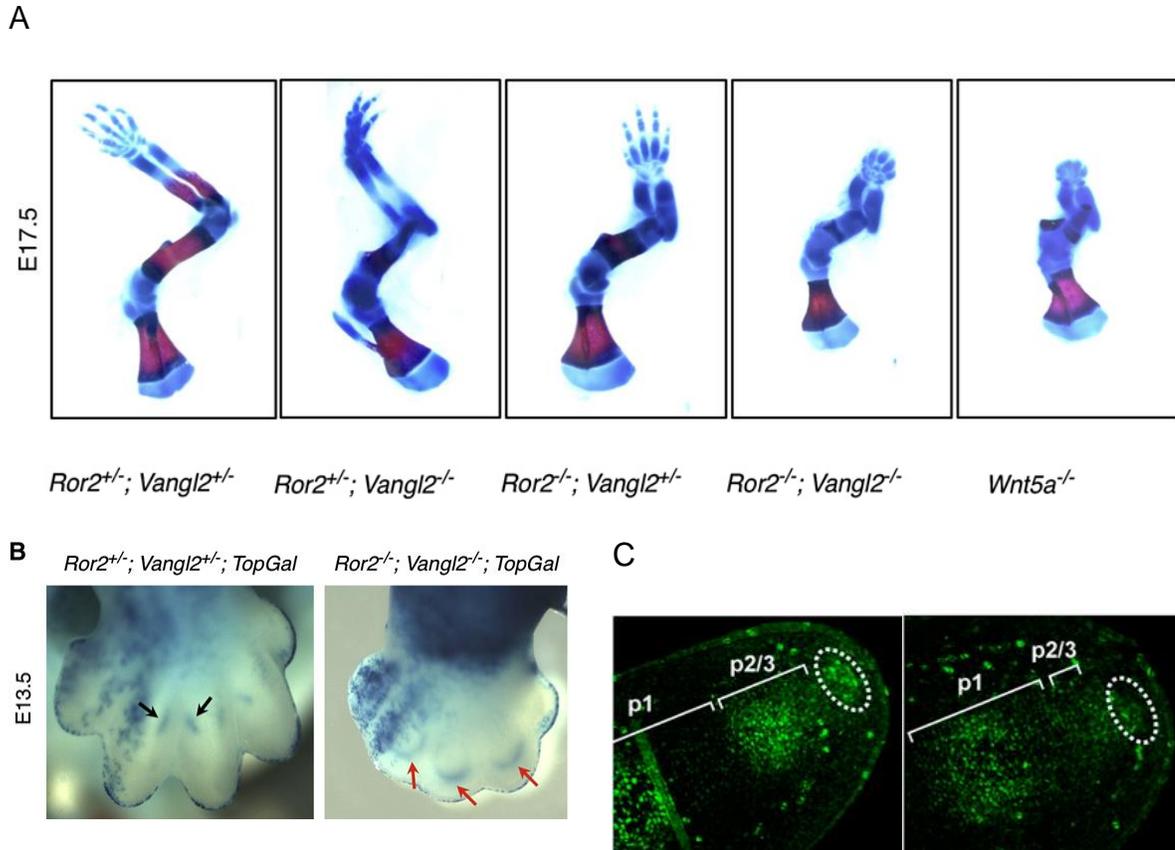
**Figura 13.** (a,c) Tinción de esqueleto y disección del miembro anterior en un embrión normal. (b,d) Tinción de esqueleto y disección del miembro anterior en un embrión mutante *Wnt5a*. (modificada de Yamaguchi *et al.*, 1999).



**Figura 14.** Marcaje de X-Gal para el repotero *LacZ*, expresado bajo el promotor del gen de cartílago diferenciado *Noggin* en embriones normales de día de gestación 11.5 a 13 (a,c,e,g) y en embriones mutantes *Wnt5a* (b,d,f,h; modificada de Yamaguchi *et al.*, 1999).

Una forma de explicar cómo se pasa de un estado indiferenciado al compromiso celular para diferenciarse a cartílago en la región distal es a través de regular la señalización  $\beta$ -catenina. WNT5A, además de activar la señalización no canónica, es capaz de inducir la degradación de  $\beta$ -catenina por una vía independiente al

marcaje de GSK3 $\beta$ . Al sobre-expresar *Wnt5a* se acelera la degradación de  $\beta$ -catenina, a través de la activación de las enzimas SIAH2 y  $\Delta\beta$ -TRCP (Topol *et al.*, 2003). Diferentes publicaciones muestran que los cambios en el desarrollo debido las mutaciones de *Wnt5a*, *Ror2* o *Vangl* están relacionadas a un incremento anormal de la actividad de  $\beta$ -catenina en la punta de los dedos (Topol *et al.*, 2003; Witte *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011; Figura 15). Por ejemplo, en un tipo de mutación de ROR2 denominada *Ror2*<sup>W749X/W749X</sup> el número de células positivas a la señalización SMAD 1,5,8 de la DC/PFR es menor que en los dedos normales y aún menor a la ausencia total de *Ror2* (Figura 15). Se ha propuesto que el reducido reclutamiento celular de la zona indiferenciada a los dedos es debido a una baja actividad de señalización no canónica porque WNT5A se queda adherido a *Ror2*<sup>W749X/W749X</sup> (Witte *et al.*, 2010), pero aún se desconoce cuál de las rutas de señalización es la que participa en este proceso.



**Figura 15.** (A) Tinciones de esqueleto a partir de disecciones de extremidades anteriores donde se aprecian embriones normales, mutantes de *Vangl2*, mutantes de *Ror2*, doble mutante de *Vangl2/Ror2* y mutante de *Wnt5a*. A pesar de tener un acortamiento de la extremidad en mutación de *Ror2*, solo el doble mutante *Vangl2/Ror2* tiene el fenotipo similar a la ausencia de *Wnt5a*. (B) Marcador de X-Gal para evidenciar actividad del reportero *LacZ* de la señalización WNT/ $\beta$ -catenina en embriones normales y mutantes dobles de *Vangl2/Ror2*. Se observa una actividad ectópica de señalización canónica en la punta de los dedos de embriones mutantes. (C) Inmunofluorescencia de las proteínas SMAD 1,5 Y 8 fosforiladas para evidenciar el reclutamiento de células al linaje condrogénico en la punta del dedo (circulo punteado), se observan embriones con pérdida de *Ror2* (izquierda) y con mutación puntual *Ror2W749X/W749X* (derecha). Se distingue un menor reclutamiento a cartílago en mutantes *Ror2W749X/W749X* (modificada de Witte *et al.*, 2010 y de Gao *et al.*, 2011).

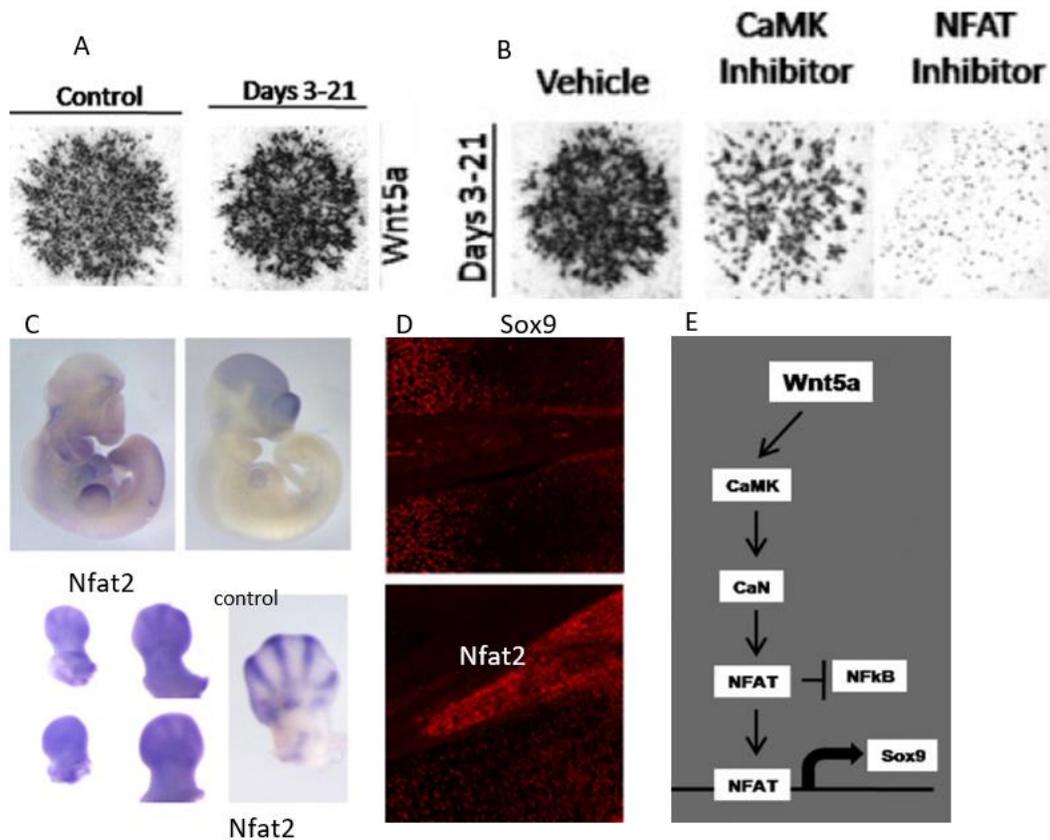
### **La señalización WNT/Ca<sup>2+</sup> en la condrogénesis.**

Existe una estrecha relación entre el control de Ca<sup>2+</sup> y la formación de cartílago en diferentes etapas. Un ejemplo es la deficiencia de Ca<sup>2+</sup> en la dieta, relacionada con la pérdida de cartílago y acortamiento de los huesos (Tuan y Lynch, 1983). En contraste, una ingesta elevada de suplementos de Ca<sup>2+</sup> produce cartílago articular y placas de crecimiento más engrosados, sugiriendo un papel importante de este mineral en la formación de nuevo cartílago (Goedegebuure *et al.*, 1986).

Una forma en la que el Ca<sup>2+</sup> intracelular participa en la condrogénesis es a través de las cadherinas. Esta familia de proteínas mantiene la unión del citoesqueleto con la matriz extracelular y son dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Mientras WNT5A promueve la agregación celular a través de Sox9, WNT5B inhibe la agregación al bloquear el complejo N-cadherina/β-catenina al reclutar a SRC para fosforilar la tirosina 654 de β-catenina (Bradley y Drissi, 2011). Esta función es importante para reducir la adhesión de las células condensadas, porque si se mantiene la expresión de N-cadherina se retrasa la diferenciación debido a que no se genera espacio para la secreción de la matriz extracelular y la proliferación (Delise y Tuan, 2002; Yang, 2003; Bradley y Drissi, 2011).

Trabajos previos han demostrado que el aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular y la sobreexpresión de Calcineurina o NFAT inducen la diferenciación a nódulos de cartílago en cultivo celular de micromasas (Tomita *et al.*, 2002, Matta *et al.*, 2008, Degala *et al.*, 2012). En adición, WNT5A tiene un papel dual en el proceso de diferenciación a cartílago. En los primeros 3 días de cultivo WNT5A induce la

activación de la señalización  $\text{Ca}^{2+}$  y la translocación de NFAT al núcleo promoviendo la expresión de Sox9. Después de 6 días de cultivo, cuando los condrocitos ya están diferenciados y en proceso de maduración, WNT5A tiene un efecto opuesto en Sox9 al inducir la translocación de NF- $\kappa$ B, por lo cual el efecto de WNT5A en promover la condrogénesis solo ocurre en el evento de condensación celular (Bradley y Drissi, 2010; Figura 16). Recientemente, se demostró la participación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  CaV1.2 y de NFAT como factores importantes en el desarrollo de los dígitos, reforzando la importancia de esta señalización en la morfogénesis del esqueleto (Atsuta *et al.*, 2019). El mismo trabajo muestra la expresión de NFAT en la zona indiferenciada y los dedos, además de una expresión ectópica de Sox9 al aumentar los niveles de *Nfat2* (Figura 16). A pesar de estas contribuciones, al evaluar a los 3 días de cultivo no se puede conocer los eventos iniciales del compromiso celular hacia la condrogénesis, y aunque TGF $\beta$  induce la expresión de receptores para WNT5A, no se ha estudiado una correlación entre ambas señales en la formación de los dedos. Además, no se ha demostrado la actividad de WNT5A en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático o en regular a NFAT en la extremidad embrionaria.



**Figura 16.** (A) Cultivo celular de micromasas en condiciones control y adicionadas con WNT5A a partir del tercer día. (B) Cultivo celular de micromasas tratadas con WNT5A solo o junto a inhibidor de CAMK o NFAT. Se puede observar una reducción en la formación de nódulos de cartílago en presencia del inhibidor de NFAT. (C) Hibridación *in situ* de *Nfat2* en embriones de ratón. Se observa en la región distal del primordio y en los dedos de etapas más avanzadas. (D) Expresión de *Sox9* en embriones normales y después de una electroporación para aumentar la transcripción de *Nfat2*. (E) Esquema representando la vía de señalización de WNT5A en los condrocitos. WNT5A inicia la señalización  $Ca^{2+}$ . Altos niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular activan a CAMK en el citoplasma. A su vez CAMK activa CaN, el cual desfosforila a NFAT para promover su transporte al núcleo celular. Una vez dentro, NFAT evita la unión de NFkB a la cromatina y promueve la expresión de *Sox9*. En ausencia de NFAT, la proteína de NFkB evita la expresión de *Sox9* (modificada de Bradley y Drissi, 2010 y de Atsuta *et al.*, 2019).

## Justificación

Como se ha indicado en la introducción, las vías de señalización WNT participan en varios procesos en el desarrollo del esqueleto y existe un antagonismo a nivel intracelular entre las distintas vías WNT. A pesar de que se han descubierto muchos efectos de la señalización no canónica de WNT en la maduración del cartílago y la morfología del esqueleto, se desconocen los mecanismos de la comunicación intracelular en la zona indiferenciada del primordio de la extremidad y en dónde inicia la diferenciación. Uno de los motivos por los cuales las mutaciones genéticas no han mostrado este fenómeno es porque tiene efectos desde etapas muy tempranas del desarrollo, como es el caso de una delección genética. Incluso en mutantes condicionales se ha explorado desde el inicio del primordio, antes de la formación de los dígitos. Trabajos previos confirman la participación de la señalización WNT/Ca<sup>2+</sup> en la condrogénesis *in vitro*, la expresión distal de *Wnt5a* en el primordio, la reducción del reclutamiento de las células al linaje condrogénico en mutantes del correceptor *Ror2* y la presencia de NFAT en la formación de los dedos. Tomando en cuenta los antecedentes, en el presente trabajo se estudió la actividad de WNT5A y la señalización Ca<sup>2+</sup>-NFAT para conocer su participación en la zona indiferenciada y la condrogénesis. En esta tesis se usó como estrategia la implantación de proteínas reguladoras de WNT, quelante de Ca<sup>2+</sup> e inhibidores específicos de proteínas activadas por Ca<sup>2+</sup> en embriones de pollo y aplicarlas directo en la zona indiferenciada para poder explorar este fenómeno con mayor detalle. También se aprovechó el modelo de

formación del dedo ectópico por la implantación de TGF $\beta$  en el tercer interdígito para entender si la señalización WNT-Ca<sup>2+</sup> actúa de forma permisiva o instructiva en la condrogénesis.

## **Hipótesis**

La proteína WNT5A promueve la diferenciación a cartílago a través de aumentar los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular y activar a CaN-NFAT en la zona indiferenciada.

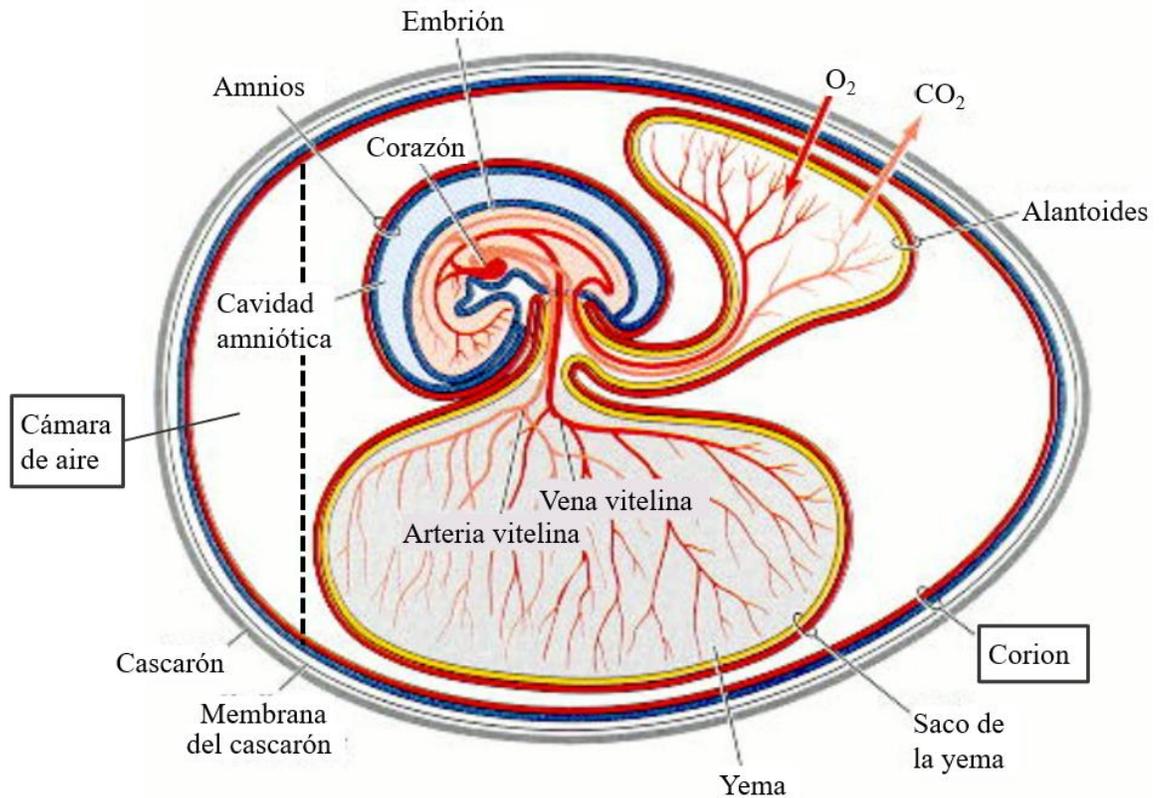
## **Objetivos**

1. Conocer si WNT5A y los antagonistas DKK y SFRP cambian los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular o si se altera la señalización Ca<sup>2+</sup> en la zona indiferenciada.
2. Conocer si la inhibición de moléculas de la señalización Ca<sup>2+</sup> afectan la diferenciación a cartílago.
3. Conocer si WNT5A actúa como señal inductora o permisiva en la condrogénesis.
4. Conocer si WNT5A participa en regular la expresión de genes marcadores del interdígito y en el proceso de muerte celular.

## **Materiales y Métodos**

### **Manipulación de embriones de pollo.**

Todos los experimentos de esta tesis fueron hechos con embriones de pollo (ALPES, Puebla, México) los cuales se incubaron hasta alcanzar las etapas de desarrollo 26 a 29 (según Hamburger y Hamilton, 1951). Se utilizó una incubadora Incumatic 1000 con una temperatura de 37°C y una humedad de 80%. En el tiempo de incubación correspondiente a la etapa de desarrollo, los huevos fueron abiertos en la región de la cámara de aire con pinzas grandes de cirugía, retirando con cuidado el cascarón y la membrana del corion (Figura 17). Cuando el embrión está expuesto, se insertaron perlas en la zona indiferenciada de la extremidad inferior derecha, región distal de aproximadamente 250 micras entre la punta del dedo III y la AER, se usaron pinzas de relojero (World Precision instruments, Sarasota, Fl., USA) y aguja de tungsteno para la manipulación.



**Figura 17.** Partes del huevo de pollo durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, se marca en recuadro la membrana del corion y la cámara de aire (modificada de Gilbert S., 2006).

Se usaron variedades de perlas distintas para cada tipo de tratamiento debido que las proteínas y los fármacos tienen distinta afinidad a los compuestos de los que están hechos las perlas. Los tipos de perla consistieron en: Perlas de Affigel (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, Cal., E.U.) con el péptido inhibidor de NFAT (11R-VIVIT; Calbiochem, Billerica, MA, E.U.) y con las proteínas TGF $\beta$ , SFRP1 y DKK1 (Peprotech, ciudad de México, México). Se usaron perlas de heparina (Sigma-Aldrich) con la proteína WNT5A (RandD systems, Northeast Minneapolis, MN, USA), y perlas de intercambio iónico AG1x2 (Sigma-Aldrich) previamente teñidas con rojo fenol 2% para el inhibidor de CAMKII (KN93; Tocris, Avonmouth,

Bristol, R.U.), el inhibidor de calcineurina FK560 y el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (BAPTA AM; Sigma-Aldrich). Los péptidos y las proteínas fueron disueltos en PBS e incubados a 4°C y para los fármacos se usó DMSO precalentando a 60° para evitar la cristalización de los compuestos. Cuando se finalizó el tratamiento de los embriones se les colocó cuidadosamente una cinta adhesiva y se les regreso a la incubadora.

### **Tinción de cartílago.**

Las extremidades inferiores fueron lavadas con Buffer de fosfatos (PBS) por 10min, posteriormente fueron fijadas en etanol 96%, deshidratadas con acetona y teñidas con una solución de rojo alizarina 0.1%, azul alciano 0.3% por 24h entre cada cambio. Después de la tinción, los embriones fueron tratados en una solución de hidróxido de potasio 1% con glicerol 20% para transparentar tejidos blandos y así visualizar el esqueleto. Se pueden observar en azul proteínas ricas en glucoproteínas sulfatadas como el cartílago y en rojo depósitos ricos de calcio como el hueso. Para terminar de transparentar el tejido los embriones se trataron en solución de etanol 50% y glicerol 50%. Al final las tinciones fueron guardadas en glicerol 50% con PBS 50%.

### **Hibridación *in situ* en embriones completos.**

Se realizaron hibridaciones *in situ* para *Bambi*, *Fgf8*, *Sox9*, *Wnt3a* Y *Wnt5a*, con sondas previamente obtenidas y almacenadas en el laboratorio y se obtuvieron las muestras de la siguiente manera.

El ARN fue extraído de primordios de extremidad de embriones de pollo entre las etapas 26 a 30 HH usando TRIZOL (Invitrogen, Cal., E.U.). Después, se generó el ADN complementario total a partir de transcripción reversa con un Kit First strand cDNA synthesis para RT-PCR (Roche Applied Science) usando el cebador con oligo (dt). Las sondas fueron clonadas usando el kit T-easy pGEM Vector System I (Promega, Wadlington, E.U,) y marcado con uracilos unidos a digoxigenina (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind., USA).

La hibridación *in situ* se realizó como ya se ha descrito en trabajos previos (Merino *et al.* 1998). Las muestras de extremidad fueron tratadas con 70 µg/ml con proteinasa K (pK) por 28min a 25°C para *Bambi* y 60 µg/ml de pK por 25min a 21°C para *Wnt5a* y *Sox9*. Para la doble hibridación de *Sox9/Fgf8* se ocupó 30 µg/ml pK por 25min a 21°C y para *Wnt3a* se usó 15 µg/ml de pK por 20min a 21°C. La hibridación y los lavados post-hibridación fueron hechos a 70°C. La reacción se visualizó con el sustrato de fosfatasa alcalina BM purple (Roche Applied science).

### **Medición de Ca<sup>2+</sup> en cultivo celular.**

Se ocuparon células de cáncer intestinal tipo RKO, debido a que tienen una elevada actividad de las vías señalización WNT, canónica y no canónicas. Se cultivaron las células hasta alcanzar una densidad de 100 millones de células por ml. Después se las adicionó PBS con 1.5 mM de Ca<sup>2+</sup> y 1.5 mM de Mg<sup>2+</sup> para dejar incubar a 37°C por 5min. Para poder medir la cantidad de Ca<sup>2+</sup> intracelular se agregó FURA2-AM a 10 µM para obtener una concentración de 10 ml de FURA-2 por cada ml de suspensión y se regresaron a incubar 5min a 37°C. Pasando la tinción, se diluyó la concentración 1:10 con PBS, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> para incubar por 20min a 37°C.

Para separar las células de la caja se colocó amortiguador Krebs-HEPES con tripsina descrito en García-Sainz y Torres-Padilla en 1999, para después ser lavados 3 veces en amortiguador y se regresaron las células a una concentración de 2.5 millones de células por ml en el mismo amortiguador. La medición se realizó con una longitud de onda de excitación a 340 y 380 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm.

### **Visualización del Ca<sup>2+</sup> intracelular e inyección de proteínas.**

Para detectar los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la punta del tercer dígito, las extremidades inferiores del embrión de pollo se inyectaron con aproximadamente 1µl de tinción fluorescente para Ca<sup>2+</sup> intracelular FURA 2 AM (Invitrogen) en una

zona de 200 $\mu$ m entre la punta del dedo y la AER en la etapa 27. Para mejorar el ingreso del colorante y tener una óptima visualización de las células teñidas se disolvió el FURA 2 AM en DMSO con ácido Plurónico F-127 al 10% (Molecular Probes, Eugene, Oregon, E.U.) y gas N<sub>2</sub> en tubos eppendorff embebido casi en su totalidad en agua a 40°C. En la inyección se ocupó una manguera, una boquilla y una microjeringa preparada a partir de capilares de vidrio (World precision instruments) y se manipularon a los embriones con un microscopio estereoscópico Stemi DV4 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Previo al momento de la inyección el colorante se mezcló con tinta china a una proporción de 1:3 para poder visualizar la zona inyectada. Los embriones tratados fueron incubados a temperatura ambiente por mínimo 30min y luego se les realizó una amputación de la pata derecha para colocarla en PBS sobre cajas de Petri con fondo de cristal (Ted Pella, Redding, Cal., USA). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) con al menos siete imágenes distintas en el plano Z para identificar el colorante en el citoplasma. Una vez obtenida la fotografía positiva a la fluorescencia, los embriones se regresaron a las cajas Petri y se les realizó una segunda inyección con proteína WNT5A, SFRP1, DKK1 (todas a una concentración de 1 mg/ml) o PBS como control, se mezclaron con tinta china 1:3 y se volvió a inyectar en la misma zona de la primera inyección con FURA.

Después de la segunda inyección, los embriones se regresaron al microscopio confocal para visualizar los cambios en el Ca<sup>2+</sup> intracelular y se fotografiaron siete veces a una distancia de 150  $\mu$ m en el plano Z con los mismos valores de

intensidad de láser, luz y apertura de diafragma que en la primera foto. Los planos del eje Z se compararon entre las dos series de fotografías y se seleccionó la misma zona entre ambas fotos.

### **Inmunofluorescencia.**

Para observar la proteína NFAT2 o la forma activa de  $\beta$ -catenina, las extremidades inferiores usadas en los tratamientos de WNT5A se fijaron en paraformaldehído 4% y se protegieron con diferentes concentraciones de sacarosa/PBS (10, 20 y 30%) por 24h cada una. Los embriones fueron incluidos en Tissue Tek (Sakura, Torrance, C.A., E.U.) y se almacenaron en un refrigerador REVCO a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de tejido se cortaron a un grosor de 26  $\mu\text{m}$ . Las muestras se incubaron con la siguiente concentración para cada anticuerpo primario usado:

- anti-NFAT2 (Abcam, Cambridge, UK) – 1:250
- anti- $\beta$ -Catenina activa (anti-ABC) 05-665 (Ser37/Thr41 desfosforilada, Millipore, Billerica, MA, USA) - 1:250

Los lavados se realizaron con Tritón al 0.3% en PBS e incubados con el anticuerpo secundario anti-Cy3 (Jackson Laboratory, Sacramento, Cal., USA) en una proporción de 1:500 por 2h a  $22-26^{\circ}\text{C}$ . Para reducir la autofluorescencia se usó sulfato de cobre 1mM en acetato de amonio 50mM después de colocar el anticuerpo secundario. La tinción del núcleo se observó utilizando el colorante 4'6'-diamino-2-fenilindol di hidroclicórico o DAPI (Sigma-Aldrich) a 1mg/ml. Finalmente, las muestras fueron montadas con Dako (Agilent, Santa clara, Cal., E.U.).

## Tinción de Lysotracker

En los tejidos que entran en proceso de apoptosis, las células reducen su PH para favorecer la formación de los cuerpos apoptóticos (Zucker *et al.*, 1998; Price *et al.*, 2003). Además, las células que fagocitan a estos cuerpos tienen una alta cantidad de actividad lisosomal, por lo tanto, un PH ácido (Zucker *et al.*, 1998). Se ha observado que teñir los cuerpos ácidos y lisosomas de fagocitos con Lysotracker coincide con tinciones de TUNEL y Azul Nilo para identificar zonas de muerte celular programada en distintos tejidos embrionarios (Zulik *et al.*, 2001; Dunty *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2003). Este método es rápido y eficiente para conocer qué tejidos entran en proceso de muerte celular programada. Por tal motivo se exploró la densidad de células que entran en proceso de muerte en el interdígito por medio de una tinción con Lysotracker.

Se ocuparon embriones de etapa 29, tratados por 24 h. Los animales fueron cortados por el tronco para conservar las dos patas posteriores y la cola. Posteriormente se enjuagaron en PBS para eliminar el exceso de sangre en los tejidos. Del PBS se pasaron los tejidos a un tubo seco y se les agregó la solución de Lysotracker donde se dejan incubar a 37°C por 15min. Para concluir la tinción los embriones fueron fijados en paraformaldehído 4% y almacenados en refrigeración a 4°C toda la noche.

Una vez teñidos, a los embriones se les realizó una deshidratación en una serie de lavados progresivos de 5min en un gradiente de metanol/PBT, de la misma forma en que se preparó la hibridación *in situ*. Después, los embriones se pasaron a una solución de 50% metanol y 50% mezcla de Benzil Benzoato y Alcohol Benzílico

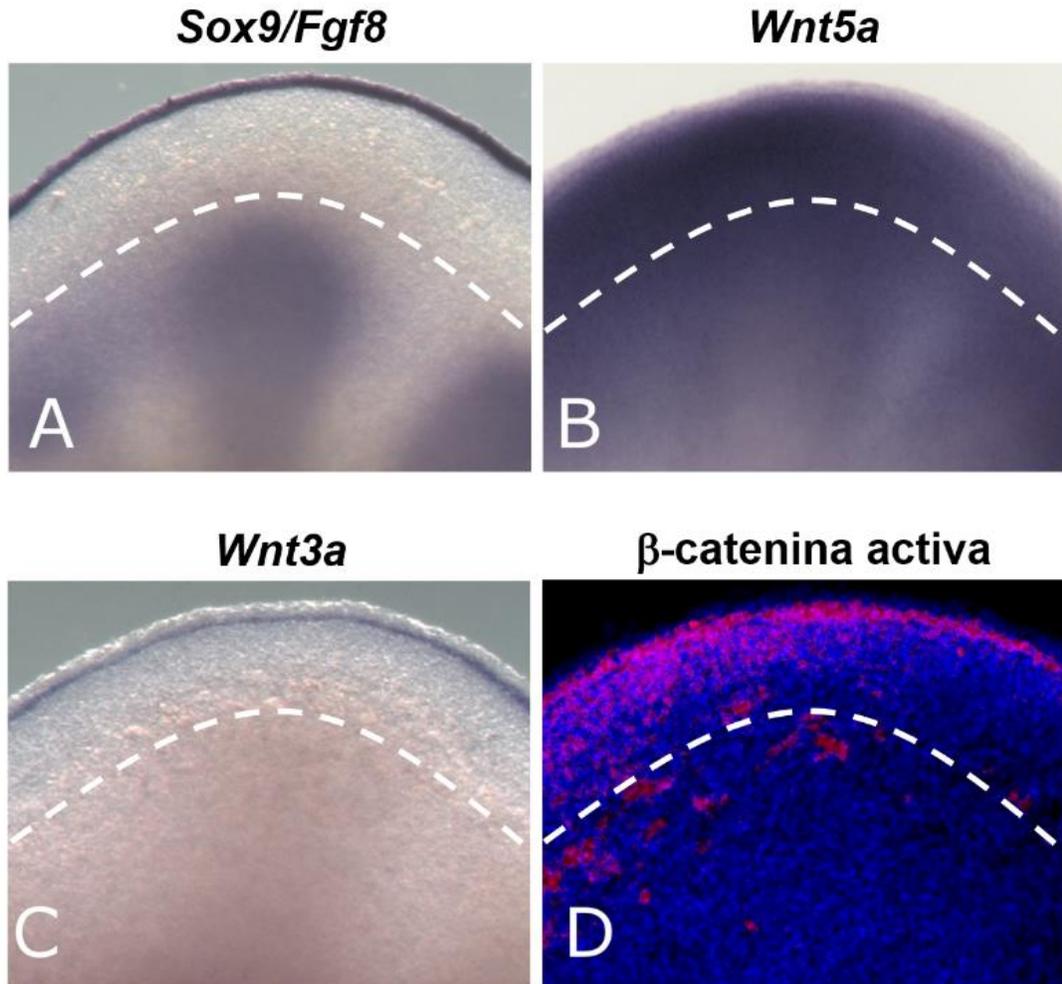
(BABB; en proporción 2:1 respectivamente), donde se dejaron 30min. Finalmente, el tejido fue embebido en la mezcla BAAB 100% para transparentar el tejido y observar los cuerpos y células fluorescentes con Lysotracker.

## Resultados

### Relación entre las proteínas WNT y la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en la condrogénesis cerca de la zona indiferenciada.

A diferencia del contexto más simple del cultivo celular, la extremidad tiene una organización tridimensional y una secuencia de procesos moleculares coordinados para dar origen a la morfología de los dedos. Se buscó conocer dónde y cuándo contribuye la señalización no canónica de WNT en la diferenciación a cartílago *in vivo*. Se realizaron hibridaciones *in situ* para conocer la expresión de los genes *Wnt* durante el desarrollo, y así poder bloquear su actividad para saber su papel en la formación de los dedos. Se observó la expresión de *Wnt5a* y *Wnt3a* cerca de la zona indiferenciada del primordio, y luego se compararon con la doble expresión de *Sox9/Fgf8*. Se puede revelar la zona indiferenciada al observar el área sin marcaje entre la expresión de *Fgf8* presente en la AER y la formación de los dígitos con *Sox9*, (Figura 18A). Al observar la expresión de *Wnt5a* (Figura 18B) su área corresponde a la zona indiferenciada mientras que *Wnt3a* se presenta solo en la base de la AER (Figura 18C). Para conocer la presencia o dónde está más activa la señalización canónica de WNT se buscó a la proteína  $\beta$ -catenina activa por inmunofluorescencia. El anticuerpo usado se une a la región desfosforilada de serina 37 o treonina 41, a la cual solo se observa en la  $\beta$ -catenina durante la señalización activa de WNT. Se observó la actividad de

señalización en la AER y la porción distal de la zona indiferenciada (de 100  $\mu\text{m}$ ), pero la actividad se reduce en la frontera de diferenciación, lugar donde sigue presente *Wnt5a* (Figura 18D).

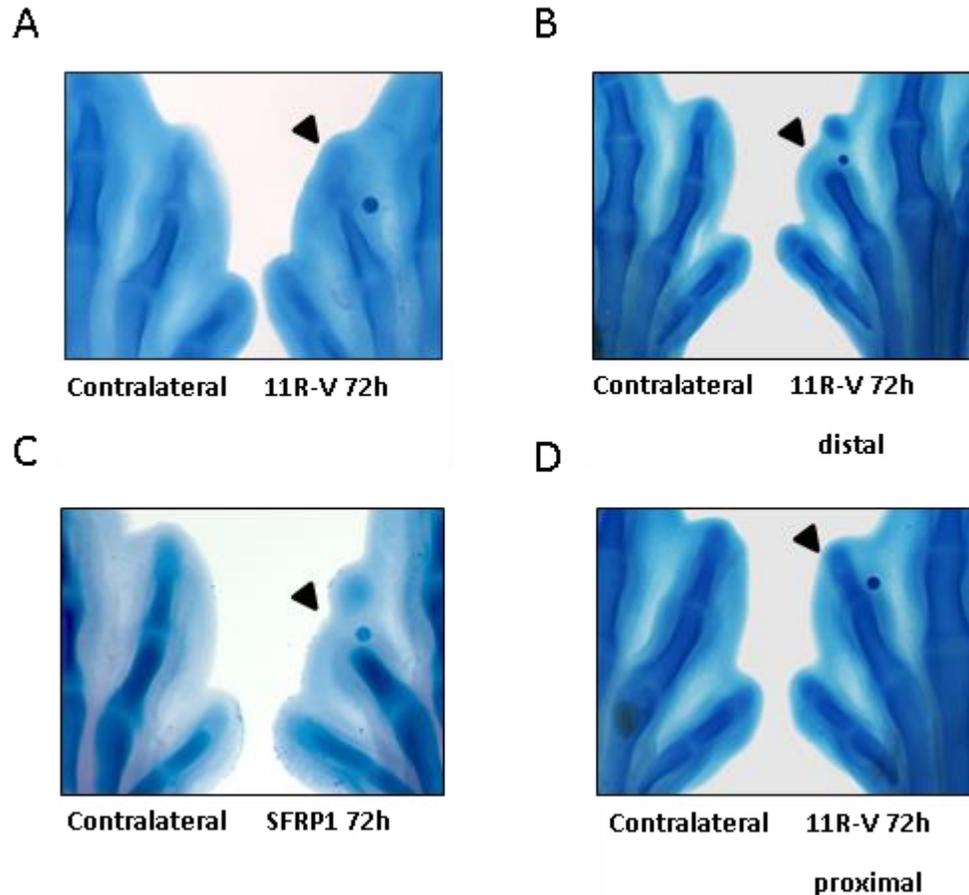


**Figura 18.** *Wnt5a* se expresa en toda la zona indiferenciada, mientras que la señalización WNT/  $\beta$ -catenina se presenta en la AER y la porción distal de la zona indiferenciada. Hibridación *in situ* doble (purpura) para *Sox9* y *Fgf8* (A), la línea blanca punteada marca el frente de diferenciación, el límite proximal de la zona indiferenciada (8 de 8). Hibridación *in situ* de *Wnt5a* (B) con una expresión alta en toda la zona indiferenciada y baja expresión en la AER (6 de 6). Hibridación *in situ* de *Wnt3a* (C) el gen se presenta en la región basal de la AER (7 de 7). Inmunofluorescencia de la proteína  $\beta$ -catenina activa (rojo) (D) presente en la AER y en la porción distal de la zona indiferenciada (3 de 3).

La proteína WNT5A es capaz de activar las rutas no canónicas de WNT en la extremidad (Ros *et al.*, 2010) y en cultivos de micromasas se observó que la señalización no canónica WNT5A/NFAT es importante para la formación de cartílago (Bradley y Drissi, 2010). Para saber si este mecanismo de comunicación celular funciona en la condrogénesis *in vivo* se colocaron perlas con el péptido inhibidor de NFAT, 11R-VIVIT, en la región anterior distal. Se redujo la intensidad de tinción para cartílago, comparando entre la extremidad izquierda no tratada y la derecha tratada (Figura 19A). Después de 72h de implantar perlas con el inhibidor de NFAT se observó una disminución en la tinción de esqueleto en el área más distal del dedo II (Figura 19B). Por lo anterior, la señalización  $Ca^{2+}$  afecta a la cantidad de matriz de cartílago. Inesperadamente, cuando se colocaron las perlas más cerca de la AER, se observó un truncamiento total en la formación del dígito (Figura 19B). Estos datos sugieren que la posición de la perla fue determinante, si la perla estaba en la zona indiferenciada, la inhibición de la condrogénesis era mayor.

Dado que WNT5A se expresa en la región distal de la extremidad, se implantaron perlas con antagonista general de WNT (SFRP1) en la zona indiferenciada para conocer si WNT participaba en la formación de los dedos. Los resultados mostraron un truncamiento del dedo (Figura 19C) muy similar al inhibidor de NFAT. Esos resultados se obtuvieron solo cuando las perlas se colocaban en la zona indiferenciada y en consecuencia se mantuvo un tejido indiferenciado distal expandido. Cuando la perla con inhibidor de NFAT quedaba colocada en tejido proximal, el dedo se formaba de manera normal (Figura 19D). Este resultado fue similar a experimentos previos donde se muta a *Wnt5a* (Yamaguchi *et al.*, 1999).

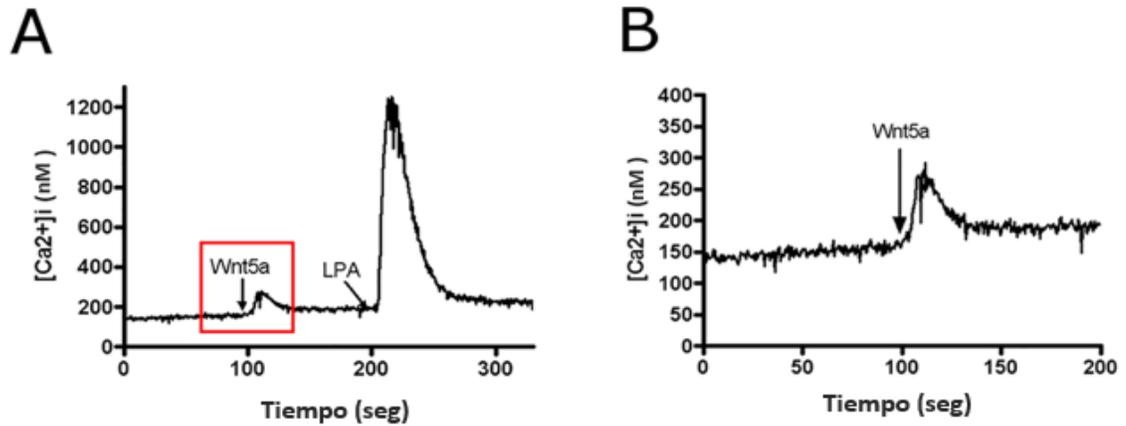
Estos datos sugieren que WNT5A activa la ruta de señalización  $Ca^{2+}$  en la zona indiferenciada para inducir cartílago.



**Figura 19.** La señalización  $Ca^{2+}$  y las proteínas WNT participan en la diferenciación del cartílago. Tinción de esqueleto en extremidad tratada con 11R-VIVIT(A). Se puede ver una ligera reducción en la tinción de cartílago (4 de 4). Una perla distal con el inhibidor (B) se pierde la formación del dedo y se mantiene extendida la zona indiferenciada (7 de 8). Tinción de esqueleto en extremidad tratada con SFRP1 en la región más distal (C). Hay una similitud del efecto en el dedo II (cabeza de flecha) respecto el tratamiento con el inhibidor de NFAT (6 de 6). Cuando la perla del inhibidor de NFAT es colocada más proximal (D), no hay cambios en la formación del dedo (7 de 7).

### **WNT5A incrementa el Ca<sup>2+</sup> citoplasmático en la zona indiferenciada.**

Para conocer si WNT5A cambia los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular se hizo un primer experimento donde se midieran los niveles de Ca<sup>2+</sup> en células en cultivo antes y después de colocar WNT5A. Se ocuparon células de cáncer de colon RKO, debido a que tienen una elevada actividad de las vías señalización WNT, canónica y no canónicas. Se comparó añadir WNT5A al medio de cultivo y posteriormente agregar ácido liso-fosfatídico (LPA; un compuesto conocido por aumentar Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma). Al momento de añadir WNT5A se observó un ligero aumento en la fluorescencia entre 100 y 150 nM de ion Ca<sup>2+</sup> (Figura 20). Cuando se agregó LPA el incremento fue de 1µM, casi 10 veces mayor (Figura 20A). Este dato muestra que WNT5A es capaz de alterar el Ca<sup>2+</sup> citoplasmático de forma moderada. Aunque el aumento por WNT5A es moderado, si se observa la expresión de *Wnt5a* está presente en abundancia en la zona indiferenciada (Figura 18) por lo que se sugiere una liberación de Ca<sup>2+</sup> constante en la región distal de la extremidad.

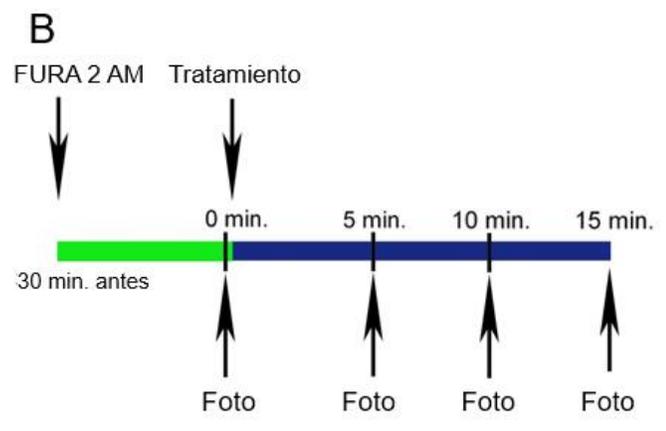
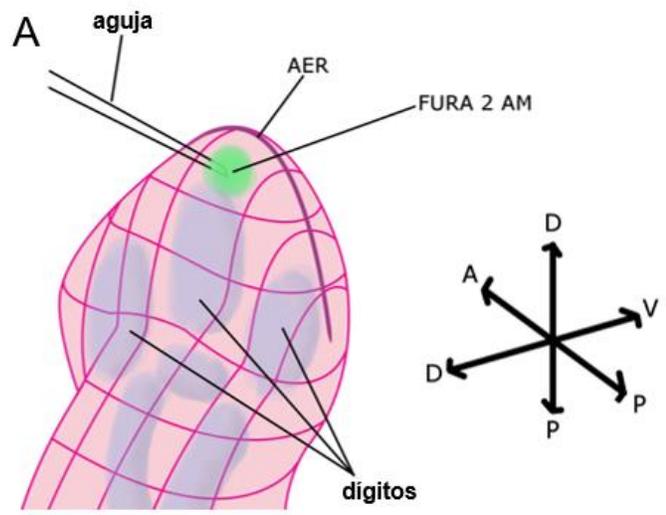


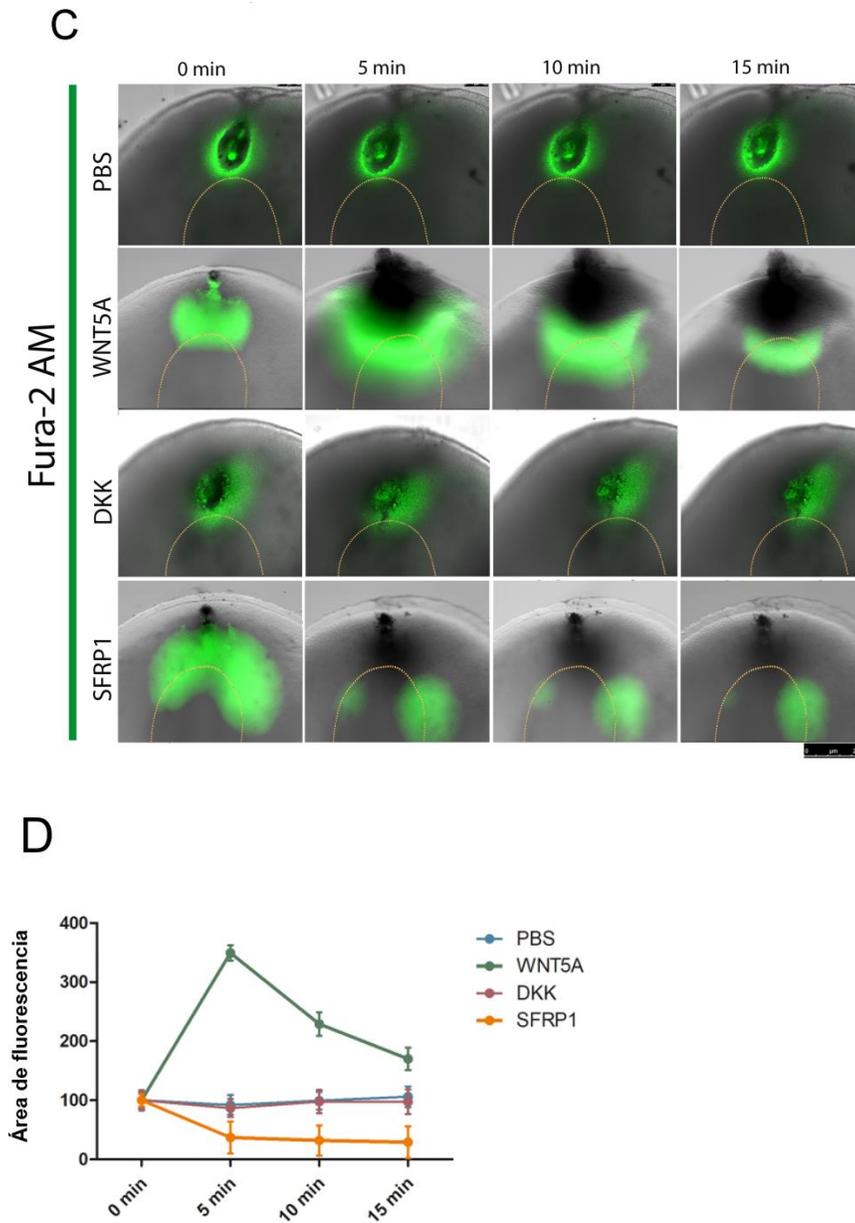
**Figura 20.** WNT5A aumenta los niveles de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma de células RKO. Medición de fluorescencia en células RKO suspendidas en PBS y en agitación. (A) Posteriormente se adicionó al medio WNT5A a los 100 segundos y LPA a los 200 segundos. Se pudo observar en el recuadro rojo un aumento de aprox. 100 nM de ion Ca<sup>2+</sup>, mientras LPA incrementó hasta 1 mM más de la media. (B). Segundo experimento con una sola adición de WNT5A, en este caso aumentó hasta 150 nM.

Posteriormente, se identificó si WNT5A era capaz de alterar el Ca<sup>2+</sup> intracelular en la zona indiferenciada. Se inició inyectando el colorante fluorescente FURA 2 AM (sensible a Ca<sup>2+</sup> citoplasmático) entre la punta del dedo II y la AER, teniendo como referencia la hibridación *Sox9/Fgf8* como se muestra en el esquema (Figura 21A). Los embriones inyectados se mantuvieron en incubación por 30min con FURA 2 AM y después se tomó una primera fotografía, tomada como el tiempo cero para cada condición, como se muestra en la gráfica de línea de tiempo (Figura 21B). Se registró en el microscopio de luz ultravioleta un área de fluorescencia alrededor del sitio de inyección, indicando presencia de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático. Es importante mencionar que cada inyección tiene una distinta área de difusión así que también se consideró esta primera fotografía como el 100% de área en cada caso. Posteriormente, se realizó una segunda inyección con tratamiento distinto por

cada condición y se tomaron fotografías a los 5, 10 y 15min postratamiento para tener un seguimiento temporal de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 21B).

Cuando se inyectó PBS, el área de fluorescencia y la intensidad no se vieron afectadas (4 de 4 casos; Figura 21C). Si la segunda inyección contenía WNT5A a 1 mg/ml, se incrementó tanto la intensidad como el área de fluorescencia (6 de 6 casos), lo cual no ocurre si se inyecta el antagonista de la vía WNT canónica, DKK1 (5 de 5 casos; Figura 21C). En contraste, si se inyecta el antagonista general de WNTs, SFRP1 a 1mg/ml, se inhibe una porción de la tinción en la zona distal (5 de 5 casos; Figura 21C). Tomando en cuenta que SFRP1 inhibe todos los WNTs y la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona indiferenciada (Figura 21D) además de su efecto en la condrogénesis (junto al inhibidor de NFAT; Figura 19), se sugiere que las WNTs participan en la condrogénesis por la vía no canónica WNT- $\text{Ca}^{2+}$ -NFAT. Si el efecto de WNT5A en la fluorescencia fue opuesto respecto a SFRP1 (Figura 21D), es muy probable que WNT5A sea el ligando que contribuye en activar NFAT para regular la condrogénesis.

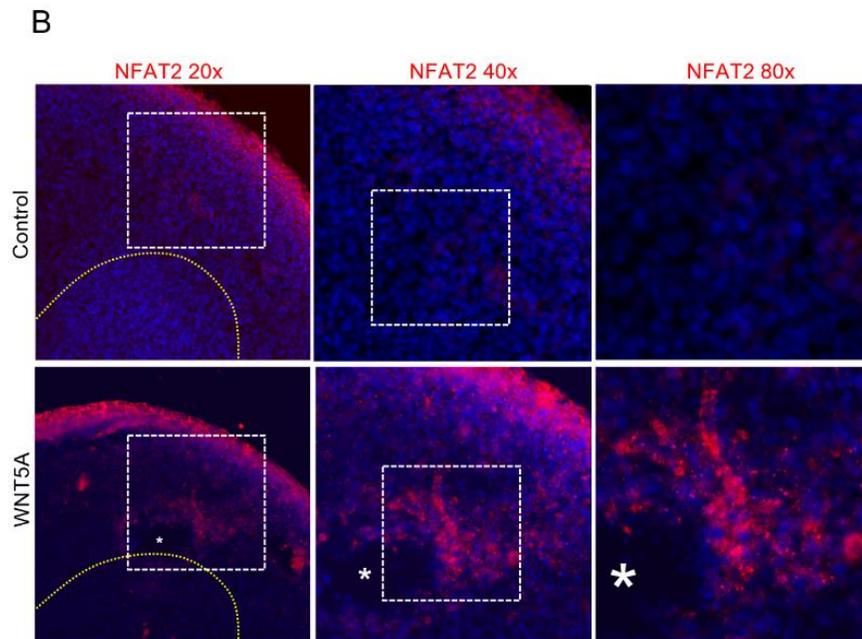
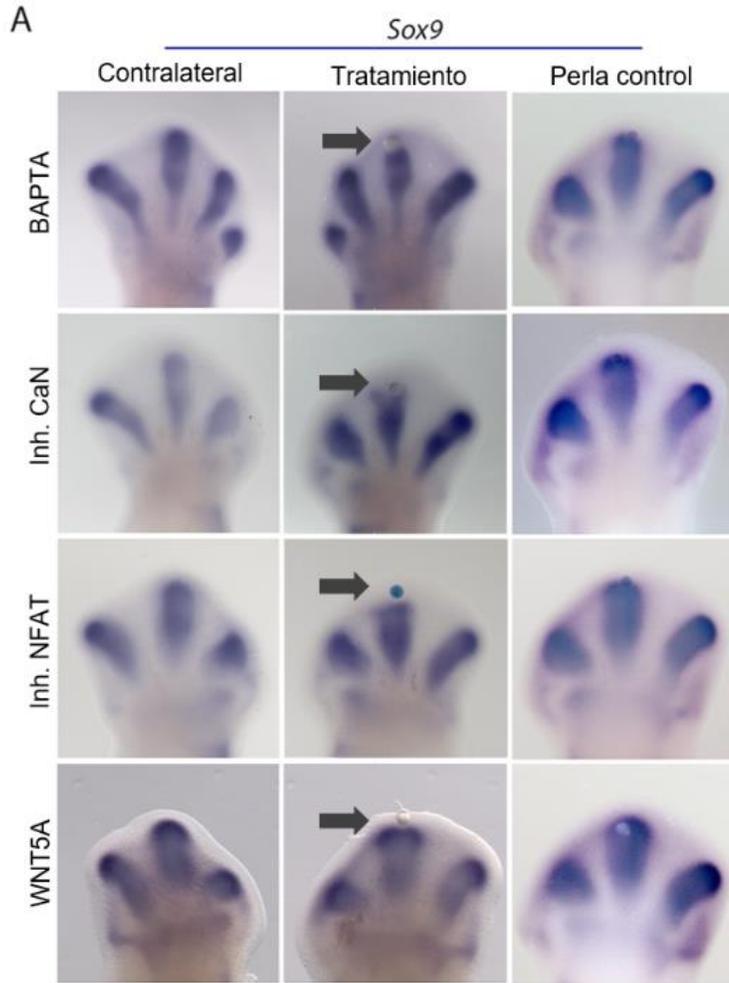




**Figura 21.** WNT5A promueve la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en la punta del dígito embrionario. Tinciones con el colorante FURA 2-AM fotografiadas a distintos tiempos para observar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona indiferenciada. (A) esquema de la inyección en la extremidad. (B) línea temporal del proceso experimental: primera inyección de FURA 2-AM, a los 30min se tomó una primera fotografía, marcada como tiempo cero. Posteriormente, se realizó una segunda inyección con PBS, WNT5A, DKK1 o SFRP1, tomándose una siguiente foto a los 5, 10 y 15min después de la inyección. (C) Se observa un incremento en el área de fluorescencia después de inyectar con WNT5A (6 de 6). En el caso de SFRP1 se redujo una porción del área fluorescente desde los 5 minutos (5 de 5). (D) Grafica temporal tomando en cuenta todos los embriones tratados con barras de desviación estandar para cada tiempo. Se evidencian los efectos visibles en (C).

## **WNT5A participa en la condrogénesis a través de la señalización Ca<sup>2+</sup>-CaN-NFAT**

La señalización Ca<sup>2+</sup>-NFAT es activada por los altos niveles del ion Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma (ya sea por su liberación del retículo endoplásmico o de su ingreso del espacio extracelular) activando, entre otras proteínas, a la fosfatasa CaN. Una vez unidas, CaN desfosforila a NFAT, la cual será transportada al núcleo para unirse a complejos proteicos del ADN e iniciar transcripción (Crabtree *et al.* 2002). Para conocer el papel de la señalización Ca<sup>2+</sup>, a través de NFAT, en la diferenciación celular a cartílago en los dígitos, se implantaron perlas con fármacos específicos para distintos momentos de activación en la transducción de señales de esta vía. Primero se utilizó un quelante de Ca<sup>2+</sup> (BAPTA AM, para evitar la acción de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma). Se observó una reducción en la expresión de **Sox9** alrededor de la perla en la punta del dedo III a las 12h de tratamiento, en contraste con un perla control (Figura 22A). De forma similar, tanto el uso del inhibidor de CaN (FK506, 5 de 8 casos) como el inhibidor de NFAT (11RVIVIT, 5 de 7 casos) dieron los mismos resultados al reducir **Sox9** en la punta del dedo (Figura 22A). Al obtener el mismo resultado con los distintos fármacos se sugiere que la señalización Ca<sup>2+</sup> a través de la activación de CaN y NFAT contribuye en la condrogénesis.



**Figura 22.** WNT5A regula la condrogénesis a través de la señalización Ca<sup>2+</sup>-CaN-NFAT. (A) Hibridación *in situ* de Sox9 en embriones tratados con perlas embebidas en quelante de Ca<sup>2+</sup>, inhibidor de CaN, inhibidor de NFAT o en WNT5A. Se puede apreciar una reducción de Sox9 a las 12h, al reducir el Ca<sup>2+</sup> o al inhibir CaN o NFAT. En contraste, se distingue un mayor grosor de la puna del dedo cerca de la perla embebida con WNT5A. (B) Inmunofluorescencia de la proteína NFAT2 (rojo) en la extremidad embrionaria de etapa 27 HH en distribución normal y después de 2h de inserción de perla con WNT5A. Se observa una mayor cantidad de NFAT2 en células alrededor de la perla (asterisco). El aumento de NFAT2 coincidió con una redistribución de la proteína en el núcleo celular en aumento 80x.

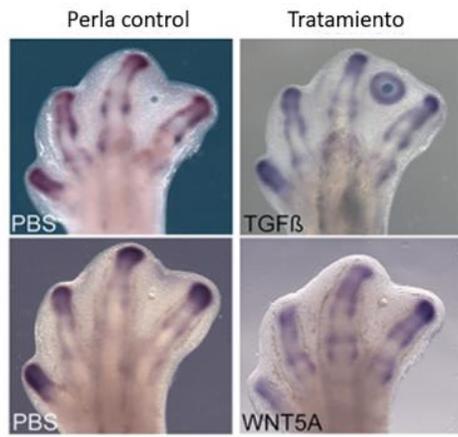
Si WNT5A participó en regular los niveles de Ca<sup>2+</sup> en la zona indiferenciada, se consideró implantar WNT5A en la punta del dedo, esperando un aumento en la formación de cartílago. En efecto, al implantar perlas embebidas con WNT5A se incrementó el grosor en el área distal de expresión de Sox9 a las 12h (Figura 22A) y además se mantuvo el área de la zona indiferenciada.

Al ver la condrogénesis y el Ca<sup>2+</sup> citoplasmático regulados por WNT5A, se buscó si el ligando cambia la distribución de NFAT en las células de la zona indiferenciada. Al realizar una inmunofluorescencia de NFAT2, su distribución se encontró en el citoplasma de las células de la AER y la zona indiferenciada (Figura 22B). Cuando se realizó el tratamiento con WNT5A se generó un aumento de concentración y redistribución de la proteína en las células cercanas a la perla 2h después. A diferencia de lo observado en el citoplasma, en la inmunofluorescencia de NFAT2 de embriones tratados se pudieron observar altas concentraciones de la proteína en los núcleos celulares (Figura 22B). En conjunto, los datos aportan evidencia sobre el control de la condrogénesis por WNT5A mediado por la señalización de Ca<sup>2+</sup>-CaN-NFAT.

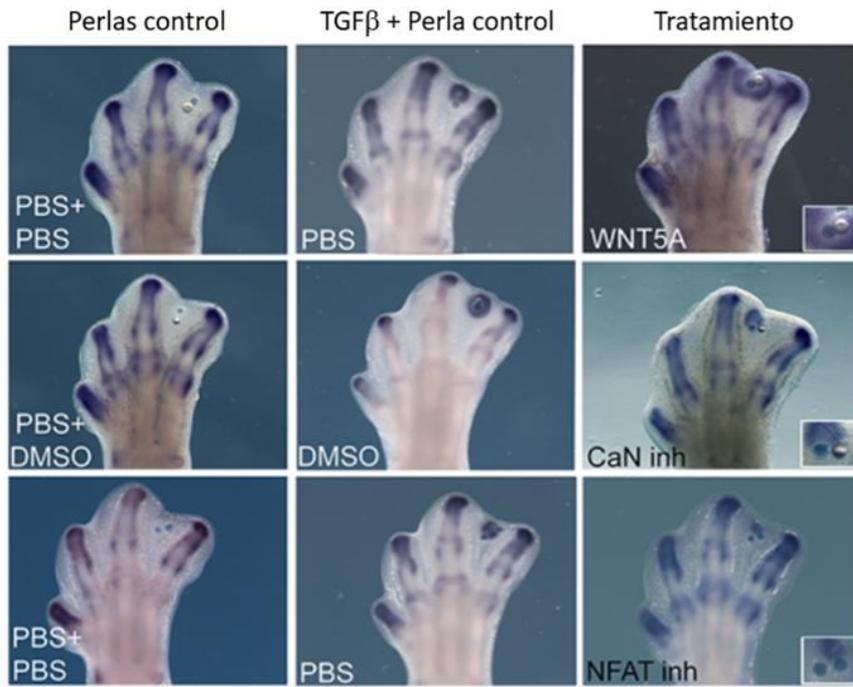
**La señalización de WNT5A/Ca<sup>2+</sup> actúa como factor permisivo en la inducción a cartílago favorecida por TGFβ en la zona indiferenciada del interdígito.**

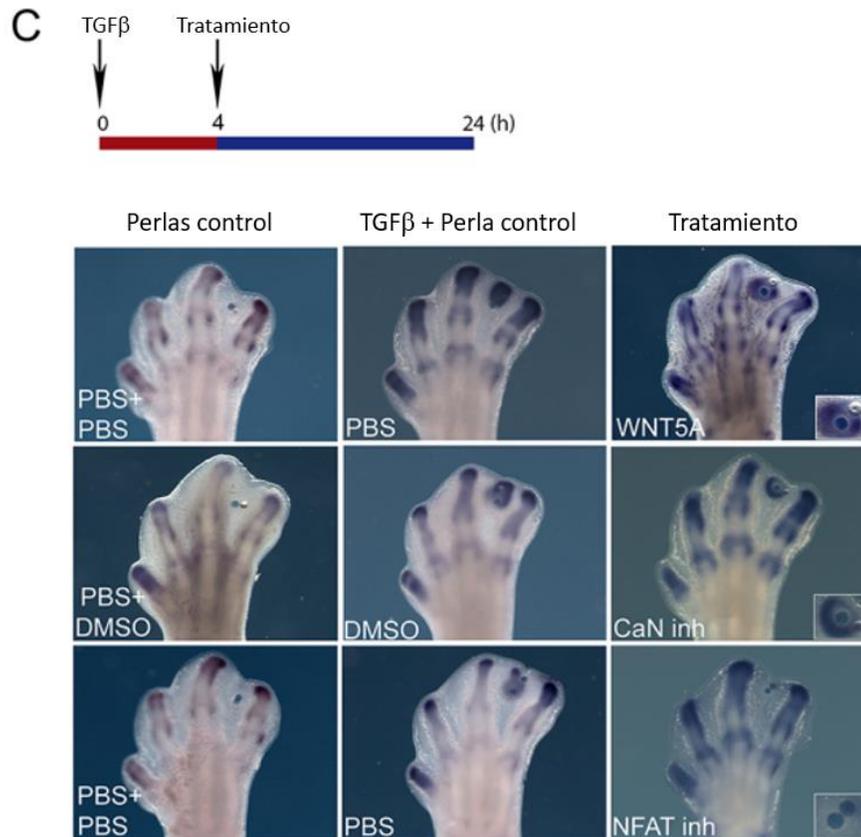
Debido a que los experimentos anteriores se realizaron en zonas precondrogénicas de la punta del dedo III, se desconoce si el aumento de células diferenciadas es del tejido condensado de la creciete digital o de la zona indiferenciada. Se procedió a indagar los efectos de WNT5A en el tejido distal del interdígito, ausente de células donde se produzcan otras señales condrogénicas. Para resolver esta pregunta se aprovechó el modelo de inducción del dedo ectópico colocando una perla embebida con TGFβ en el interdígito III de etapa 29 HH (Gañan *et al.*, 1996). Se pudo observar que TGFβ indujo la expresión de Sox9 a las 24 h, tomando la forma de los dígitos adyacentes (Figura 23A). Esto nos da elementos para pensar que TGFβ funciona como una señal instructiva para inducir la condrogénesis en las células indiferenciadas del interdígito. En contraste, colocar una perla embebida en WNT5A no indujo expresión de Sox9 en el interdígito (Figura 23B). Este resultado sugiere que WNT5A no actúa de forma instructiva de la condrogénesis, como ocurre con TGFβ.

A



B





**Figura 23.** La señalización WNT5A-CaN-NFAT actúa de forma permisiva en la condrogénesis. (A) Hibridación *in situ* para Sox9 en embriones con perlas de affigel o heparina en el tercer interdígito, embebidas en PBS (3 de 3) o embebidas en TGFβ (6 de 6) o WNT5A. A diferencia de TGFβ, WNT5A no es capaz de inducir Sox9 en el interdígito (3 de 3). (B) Hibridación para Sox9 en embriones 24h después de ser tratados con una primera perla de TGFβ y un segundo tratamiento 1h después de TGFβ con perlas embebidas en WNT5A (4 de 4) o los inhibidores de CaN (3 de 3) y de NFAT (3 de 3). WNT5A fue capaz de incrementar Sox9 con respecto a un tratamiento solo de TGFβ si se colocaba la segunda perla 1h después. (C) Hibridación para Sox9 en embriones 24h después de ser tratados con una primera perla de TGFβ y un segundo tratamiento una 4h después de TGFβ con perlas embebidas en WNT5A (4 de 4) o los inhibidores de CaN (3 de 3) y de NFAT (3 de 3). En el caso de los inhibidores, NFAT tuvo mayor efecto en inhibir la expresión de Sox9.

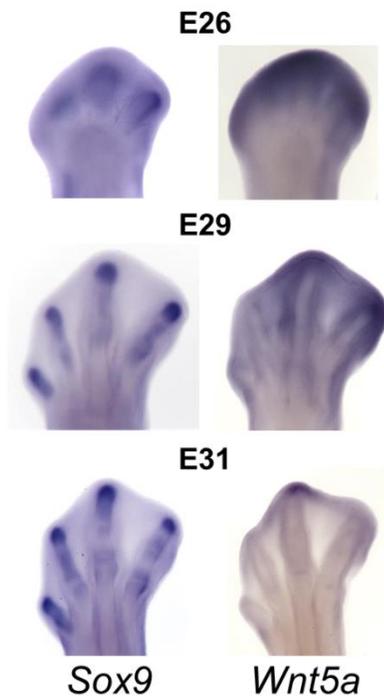
A diferencia de colocar WNT5A solo, un doble tratamiento de TGF $\beta$  y WNT5A generó un área mayor de expresión de Sox9 en el interdígito. Al colocar WNT5A 1h después de TGF $\beta$  y dejar 24h se observó una mayor diferencia en la expresión de Sox9 (Figura 23B). Este efecto fue menor cuando WNT5A se colocaba 4h después (Figura 23C).

Para corroborar si WNT5A actúa a través de la señalización de CaN-NFAT en el interdígito (de forma similar a la punta del dedo), se utilizaron los inhibidores de CaN y NFAT después de inducir con TGF $\beta$ . Si el inhibidor de NFAT era colocado 4h después de TGF $\beta$ , se redujo casi por completo la expresión de Sox9 a las 24 h, bloqueando la formación del dedo ectópico (Figura 23C). Esta reducción fue menor si los inhibidores eran colocados 1h después de TGF $\beta$  (Figura 23B), aunque en todas las condiciones los inhibidores generaron menor área de expresión de Sox9. Estos datos sugieren que el papel de la señalización WNT5A-CaN-NFAT actúa como un factor permisivo para la cascada molecular de la condrogénesis inducida por TGF $\beta$ .

### **Participación de la señalización WNT5A-CaN-NFAT en el tejido interdigital para la diferenciación a cartílago.**

Cuando se observa la expresión de **Sox9** entre etapa 26 y 31, el tejido de la punta del dedo sigue generando nuevo cartílago por la expresión restringida de **Sox9** (Figura 24). Si se compara con la expresión de *Wnt5a*, las células positivas a este gen están presentes en toda la zona indiferenciada, pero se van restringiendo al

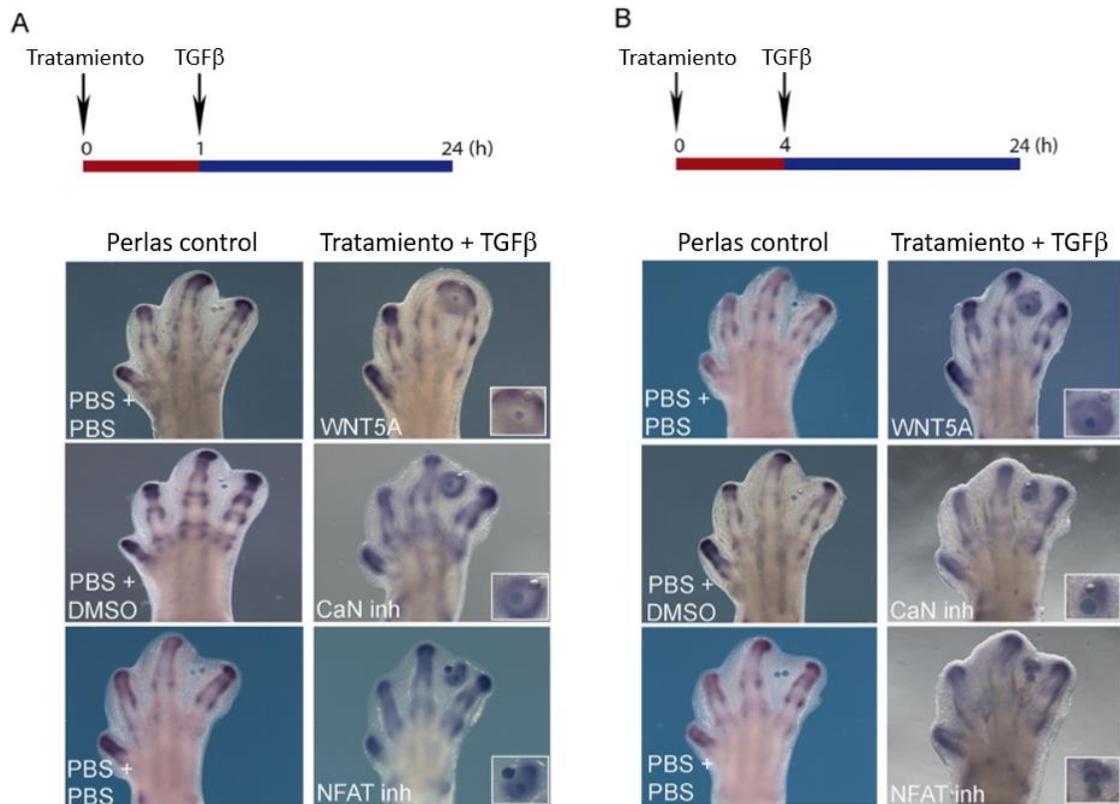
tejido adyacente y distal a **Sox9** en la punta del dedo entre la etapa 29 a 31, de manera más notoria en el dedo III (Figura 24). Se puede sugerir entonces que el efecto de WNT5A en la zona indiferenciada precede a TGF $\beta$  al momento de inducir la condrogénesis. Al ver que la señalización de WNT5A-CaN-NFAT actúa como factor permisivo después de colocar a TGF $\beta$ , se exploró el papel de esta señalización en promover el compromiso al linaje condrogénico en la zona indiferenciada.



**Figura 24.** Patrones de expresión de *Sox9* y *Wnt5a* en los dedos de pollo. Se puede notar que la continua expresión de *Sox9* esta presente en la punta de los dedos (DC/PFR). En comparación, *Wnt5a* inicia en el mesénquima distal pero conforme avanza el desarrollo, la expresión se restringe a la DC/PFR, sobre todo en los dedos III y IV, los cuales mantienen su crecimiento.

Para determinar si las células de la zona indiferenciada se comprometen a la condrogénesis por la señalización de WNT5A-CaN-NFAT, se aprovechó el modelo

de inducción de cartílago al colocar perlas de TGF $\beta$  en el interdígito (Gañan *et al.* 1996). Así, se realizaron experimentos de ganancia y pérdida de función previo a la diferenciación a cartílago. En estos experimentos se realizó el tratamiento 1h y 4h antes de colocar perlas de TGF $\beta$ . Se observó un incremento de la expresión de **Sox9**, que resultó en la fusión de los dedos, cuando se colocó WNT5A 1h antes de TGF $\beta$  (Figura 25A). La pérdida de actividad en NFAT generó una reducción en el área de **Sox9** si el inhibidor se colocaba 4h antes de TGF $\beta$  (Figura 25B). Estos datos sugieren que la señalización de WNT5A-CaN-NFAT actúa favoreciendo la respuesta de TGF $\beta$  al aumentar el número de células comprometidas a la condrogénesis.



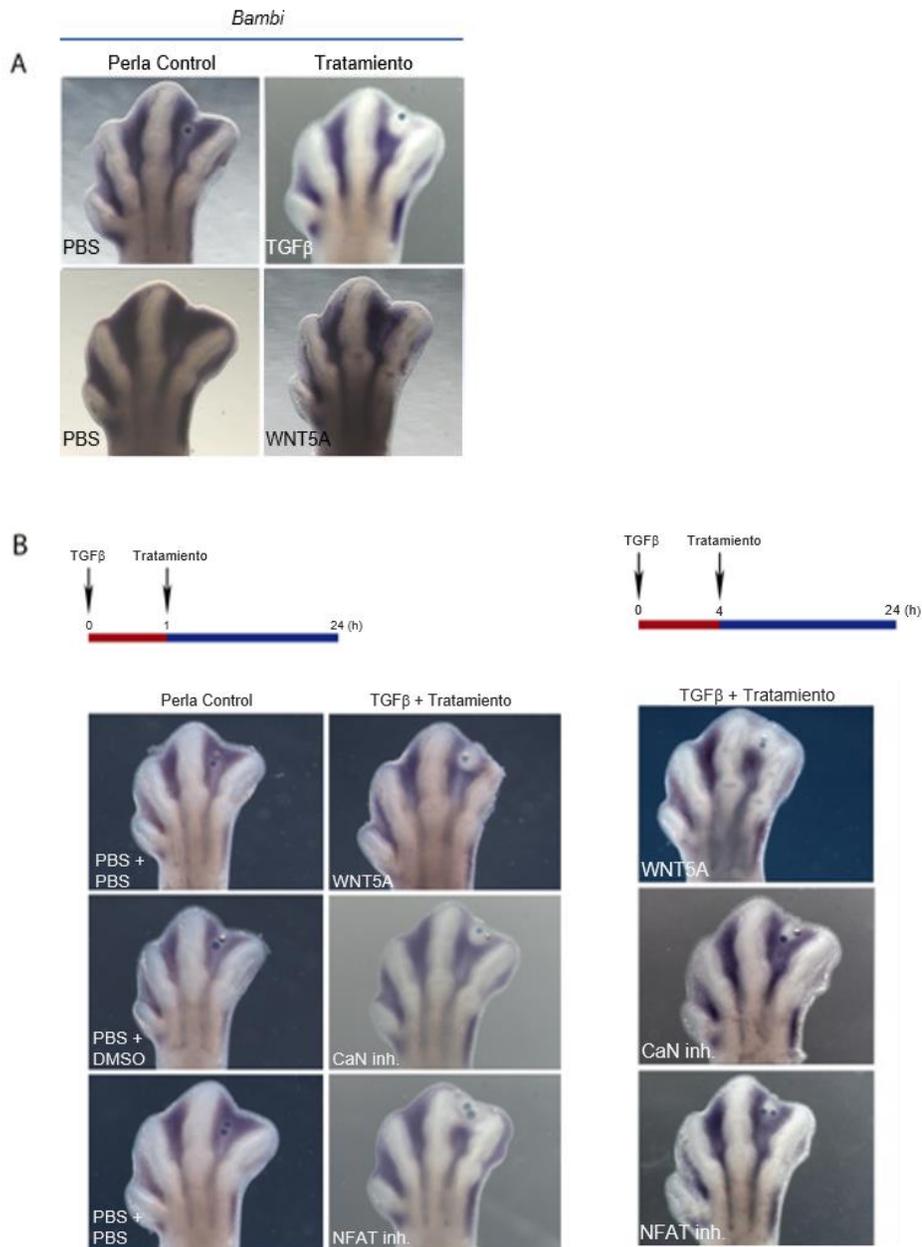
**Figura 25.** La señalización WNT5A-CaN-NFAT participa en el compromiso interdigital hacia la diferenciación a cartílago (A) Hibridación para Sox9 en tratamientos con WNT5A o los inhibidores de CaN o NFAT 1h antes de TGF $\beta$ . Se puede observar un incremento del área de Sox9 en los tratamientos con WNT5A (3 de 3), no se observó efectos con los inhibidores de CaN (0 de 3) y de NFAT. (B) Hibridación para Sox9 en tratamientos con WNT5A o los inhibidores de CaN o NFAT 4h antes de TGF $\beta$ . Se puede observar una ligera reducción del área de Sox9 en los tratamientos con el inhibidor de NFAT (1 de 3), no se observó efectos en los otros tratamientos de WNT5A (0 de 3) e inhibidor de CaN (0 de 2).

**El mantenimiento de la condrogénesis por la vía WNT-CaN-NFAT es**

**independiente de la muerte celular.**

La formación del dedo ectópico en el interdígito inducida por TGF $\beta$  es precedida por la inhibición de los genes marcadores del interdígito (Montero et al. 2008) y un

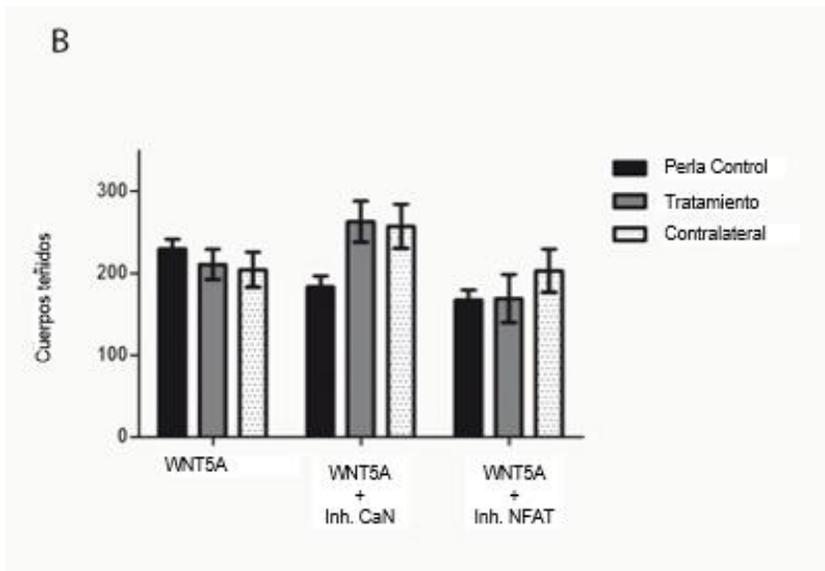
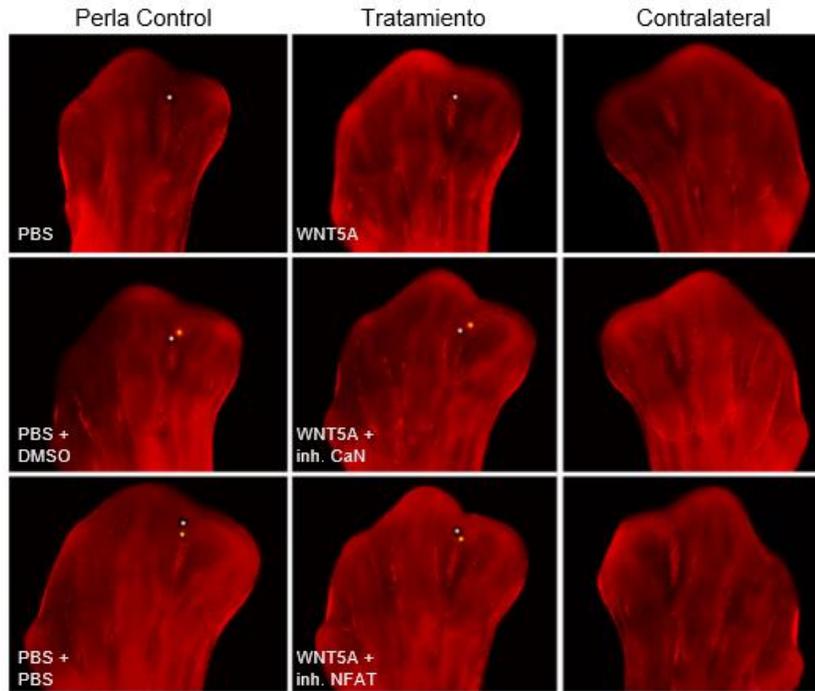
bloqueo de la muerte celular (Gañan *et al.* 1996). Debido a que la señalización de WNT5A-CaN-NFAT actúa después del inicio de la cascada molecular generada por TGF $\beta$ , se exploró si afecta la identidad del interdígito de forma independiente a TGF $\beta$  o si es exclusiva para el reclutamiento celular hacia la condrogénesis. Para ello, se colocaron perlas embebidas en WNT5A y se hibridaron para el marcador de interdígito ***Bambi***. No se observaron cambios de ***Bambi*** 24h pos-tratamiento en el interdígito, a diferencia de la evidente inhibición del gen después de 24h de colocar TGF $\beta$  (Figura 26A). Posteriormente, se colocaron perlas en el mismo orden temporal que la Figura 20, usando TGF $\beta$  seguido de WNT5A o los inhibidores de CaN y NFAT a 1h y 4 h, solo que en esta ocasión se hibridaron para ***Bambi***. De forma inesperada, ni WNT5A ni los inhibidores de CaN y NFAT lograron revertir el efecto de TGF $\beta$  en el interdígito (Figura 26B). Estos resultados sugieren que WNT5A es exclusivo en la diferenciación a cartílago, sin cambiar la identidad del interdígito.



**Figura 26.** La señalización WNT5A-CaN-NFAT actúa de forma independiente a la identidad interdigital. (A) Hibridación *in situ* para *Bambi* en embriones con perlas de affigel o heparina en el tercer interdígito, embebidas en PBS (3 de 3), en TGF $\beta$  (3 de 3) o WNT5A. A diferencia de TGF $\beta$ , WNT5A no inhibe *Bambi* en el interdígito (0 de 3). (B) Hibridación para *Bambi* en embriones 24h después de ser tratados con una primera perla de TGF $\beta$  y un segundo tratamiento 1h o 4h después de TGF $\beta$  con perlas embebidas en WNT5A (4 de 4 para 1h y 4 de 4 para 4h) o los inhibidores de CaN (3 de 3 para 1h y 3 de 3 para 4h) y de NFAT (3 de 3 para 1h y 3 de 3 para 4h). Solo en el caso de tratamiento con inhibidor de NFAT 1h después

de TGF $\beta$  se observó mayor área de inhibición (3 de 3). En las condiciones de inhibición de la condrogénesis por los inhibidores de CaN y NFAT se mantiene el efecto de TGF $\beta$  con *Bambi*.

En ausencia de cambios en la expresión de *Bambi* y al no obtener inducciones de cartílago ectópico por WNT5A se consideró la probabilidad de que WNT5A actúe independiente a las zonas muerte celular en la extremidad. Para conocer esta relación se realizaron tinciones de LysoTracker con tratamientos de WNT5A y los inhibidores de CaN y NFAT. En ningún caso se observaron cambios en la tinción, ni usando WNT5A de forma aislada o en combinación con los inhibidores de la señalización Ca<sup>2+</sup> (Figura 27A). Al contabilizar los cuerpos teñidos en los experimentos, la proporción entre el tercer interdígito tratado y el de la extremidad contralateral no varían de forma considerable (Figura 27B). En conjunto, los datos obtenidos sugieren que el papel permisivo de la señalización WNT5A-CaN-NFAT en la condrogénesis es independiente a los procesos que regulan la identidad y la muerte celular del interdígito en el primordio de la extremidad.



**Figura 27.** La señalización WNT5A-CaN-NFAT actúa de forma independiente a la muerte celular en el interdígito. (A) Tinción de Lysotracker para evidenciar las zonas de muerte celular en el interdígito en patrón normal (derecha) y 12h después de haber colocado perlas control (asterisco blanco para heparina y asterisco azul para affigel, fotos en columna izquierda) o perlas embebidas en WNT5A (asterisco a la par de un doble tratamiento con WNT5A e inhibidores de CaN y NFAT (fotos en columna del centro). (B) Cuantificación de cuerpos marcados con Lysotracker en interdígitos tratados con WNT5A de forma aislada o en combinación con los inhibidores de CaN y NFAT.

## Discusión

Los resultados de esta tesis han mostrado que los efectos de WNT5A en regular el  $\text{Ca}^{2+}$  y su participación en la diferenciación a cartílago solo ocurren en la zona indiferenciada de la extremidad. Esto puede deberse a que las células indiferenciadas poseen una capacidad de respuesta a WNT5A a una retroalimentación de las señales de la AER. Como se mostró, durante el proceso de crecimiento, *Wnt3a* se expresa en mayor concentración en la AER y *Wnt5a* se expresa solo en mesénquima distal con un gradiente de concentración mayor cerca de la AER y menor en la región proximal (Figura 28). Como se ha explicado, el mismo WNT5A promueve la degradación de  $\beta$ -catenina (Topol *et al.*, 2003). Esto quiere decir que la misma AER promueve a *Wnt5a* para llevar a la propia inhibición de la vía WNT/ $\beta$ -catenina. Los ratones mutantes para *Wnt5a* muestran un tejido indiferenciado más amplio que los ratones normales en la misma etapa de desarrollo, lo que refuerza la idea del reclutamiento celular afectado por la inhibición de la vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  (Kawakami *et al.*, 1999; Topol *et al.*, 2003). Tanto el tratamiento de SFRP1 como en la inhibición de CaN y NFAT muestran un incremento de distancia entre la punta del dedo y la AER. Este resultado no se observó al momento de tratar con DKK1. A su vez, los cambios de fluorescencia en  $\text{Ca}^{2+}$  y la proteína NFAT solo se observaron en las células de la zona indiferenciada. WNT3A actúa como un ligando de la vía WNT/ $\beta$ -catenina y contribuye a la represión de la condrogénesis en la extremidad (ten Berge *et al.*, 2008). Por una parte, la señalización WNT/ $\beta$ -catenina mantiene el crecimiento de la extremidad al promover a *Fgf8* en la AER, lo que favorece la división celular y

reprime la expresión de Sox9 en la zona indiferenciada (Figura 28). A pesar de que se había demostrado que WNT5A y sus correceptores reprimen la actividad de  $\beta$ -catenina en los dedos (Topol *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2011), este es el primer trabajo donde se muestra que al mismo tiempo se activa otra vía, la señalización WNT/Ca<sup>2+</sup>. Por lo tanto, ¿Cómo pueden responder las células indiferenciadas a WNT5A para formar cartílago?

Trabajos previos ya habían demostrado que el Ca<sup>2+</sup> intracelular participa en la formación a cartílago en cultivo celular (Tuan *et al.*, 1983; Tomita *et al.*, 2002; Matta *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010) y también se correlacionó con WNT5A y la señalización Ca<sup>2+</sup>-NFAT (Bradley y Drissi, 2010). Aunque se demostró esta correlación, en estos trabajos se presenta el resultado en tinciones hechas hasta los 3 días de cultivo, lo cual genera dificultad en deducir cuál es el papel de esta señalización durante la diferenciación celular temprana. Al realizar análisis *in vitro* se desconoce el mecanismo de acción y cómo interaccionan con los tejidos y las señales cercanas a la zona indiferenciada. Por ejemplo, un efecto de interés fue el hecho de que WNT5A solo formara más cartílago en la punta de dedo y no el interdígito, a menos que se colocara TGF $\beta$  en éste. Aunque en cultivos *in vitro* se había observado el incremento de tejido cartilaginoso en presencia de WNT5A (Church *et al.*, 2002; Bradley y Drissi, 2010), no se generó ningún cambio en el interdígito al colocar WNT5A, quizá por la ausencia de un receptor para este ligando. El receptor de WNT5A que puede estar actuando en potenciar los cambios en Ca<sup>2+</sup> es FZ4 debido a que su expresión está en la DC/PFR y se presenta en las primeras horas después de inducir un dedo ectópico con TGF $\beta$

(Chimal-Monroy *et al.*, 2002). El mismo gen de *Tgfβ* se expresa en la DC/PFR (Aramaki *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2008). Esto implica que las señales y cambios provocados por la DC/PFR podrían competir con las señales de la AER para promover la diferenciación celular. Por un lado, WNT5A promueve la degradación de β-catenina y por otro activa la señalización Ca<sup>2+</sup>-CaN-NFAT favoreciendo una región competente en la zona indiferenciada adyacente a las señales condrogénicas de la DC/PFR (Figura 28).

¿Qué otros datos podrían contribuir con afirmar que solo un grupo de células competentes próximas a la punta del dedo responden a WNT5A para elevar Ca<sup>2+</sup> y NFAT? De forma interesante, en la mutación *Ror2*<sup>W749X/W749X</sup> (un receptor que se une a WNT5A pero no permite su liberación del receptor) se observó una reducción de la DC/PFR con menor número de células expresando SMAD 1,5 Y 8 y baja expresión de Sox9. Al bloquear la interacción de WNT5A con otras proteínas, este fenotipo tiene un efecto mayor al eliminar *Ror2*, debido a que WNT5A todavía podría actuar con otros correceptores. Además, ROR2 no es exclusivo para la activación de la vía WNT/PCP, lo cual sugiere una posible activación de otras vías de WNT (Witte *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012). Por ejemplo, la doble mutación de los correceptores *Ror2* y *Vangl2* muestra que los fenotipos comparten características con las mutaciones de *Wnt5a*, como la presencia de zona indiferenciada extensa y dedos cortos. (Yamaguchi *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2011). Sería de interés explorar si TGFβ es capaz de inducir la expresión de *Ror2* o de *Vangl2* al momento de formar el dedo ectópico. Aunque el mutante reduce la acción de la vía WNT/PCP aún no se ha evaluado en estos

mutantes los cambios en  $\text{Ca}^{2+}$  o NFAT. Hasta el momento la vía WNT/PCP no ha explicado el incremento en la zona indiferenciada al mutar *Wnt5a*. Esto es debido a que solo ha explorado el cartílago maduro y no su diferenciación, pero sí se logró en este trabajo reproducir una extensa zona indiferenciada con la inhibición farmacológica de CaN o NFAT. En adición, se encontró la proteína NFAT2 en la zona indiferenciada, y su activación fue dependiente de WNT5A al ser aplicada en la región competente. Estos datos sugieren que la señalización WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  es la responsable de incrementar el número de células formadoras de la DC/PFR, y a su vez las señales de  $\text{TGF}\beta$  provenientes de la DC/PFR fomentan una región de competencia para WNT5A, y así promueve a *Sox9* (Figura 28).

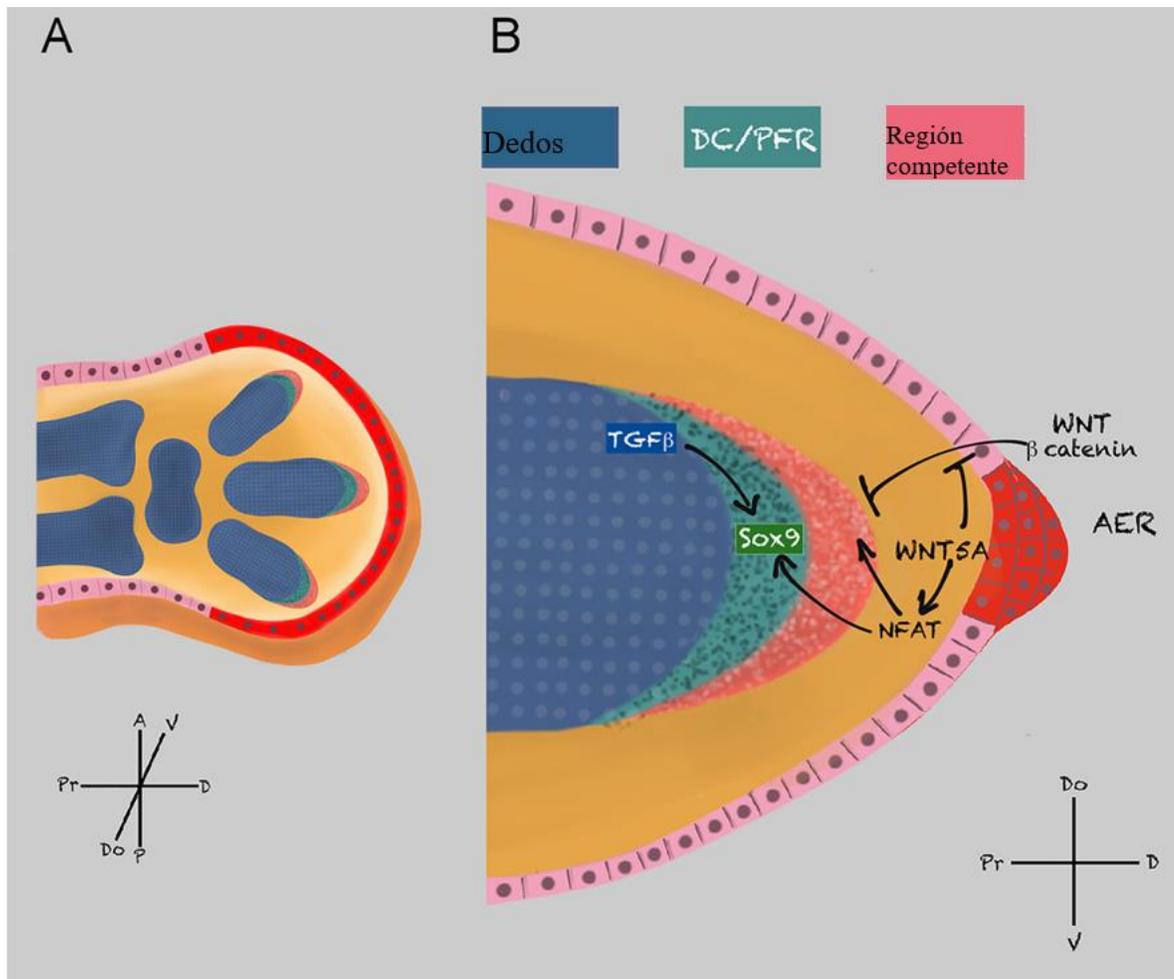
Al observar que WNT5A era incapaz de inducir la formación en el interdígito, se exploró qué otros cambios podrían generar en este tejido. En el interdígito se expresan varios genes antes del inicio de la apoptosis. Cuando se induce la diferenciación a cartílago por  $\text{TGF}\beta$ , los genes relacionados con la apoptosis en el interdígito son inhibidos y se inicia la cascada molecular de la condrogénesis (Chimal-Monroy *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2008; Diaz-Hernández *et al.*, 2013). De forma consistente, acelerar el proceso de muerte celular en el interdígito al implantar perlas con BMP, es precedido por incrementos anormales de genes propios del interdígito como son: *Bambi*, *Msx2*, *Dkk*, y *Snail* (Zuzarte-Luis *et al.*, 2004). A diferencia de los efectos de  $\text{TGF}\beta$ , *Bambi* no se vio alterado por implantar WNT5A, lo cual concuerda con el efecto nulo de WNT5A y los inhibidores de CaN y NFAT en la muerte celular. En adición, bloquear la señalización  $\text{Ca}^{2+}$  redujo la expresión de *Sox9* pero mantuvo la inhibición de *Bambi* en la condrogénesis.

Además, al evaluar la tinción de LysoTracker en los tratamientos de WNT5A y los fármacos, solo se exploró el área que coincide con la muerte celular programada. Aun sería necesario explorar la activación de la apoptosis por técnicas de TUNEL o inmunohistoquímica de Caspasas.

Como se mencionó anteriormente, la actividad de SMAD 1,5 Y 8 está presente en la DC/PFR y en el interdígito simultáneamente; aunque la respuesta celular es muy distinta. En la misma DC/PFR se induce la expresión de *Tgfβ* y activa la cascada molecular de la condrogénesis. Por lo tanto, una posible explicación es que la DC/PFR favorece la inhibición de genes del interdígito y a la par un aumento en la expresión de genes que favorecen la respuesta a la señalización WNT5A-CaN-NFAT. Al momento de teñir con FURA solo se aplicó en la zona indiferenciada adyacente al dígito. Si se realizaran evaluaciones en el interdígito permitiría entender si solo las células próximas a formar cartílago cambian los niveles de  $Ca^{2+}$  en respuesta a WNT5A.

Por último, tanto los mutantes de *Wnt5a* como los correceptores *Ror2* y *Vangl2* presentan un acortamiento de estructuras que se extienden fuera del eje corporal, como las extremidades, la mandíbula, la cola y las orejas (Gao *et al.*, 2011). A su vez, la mutación de *Nfat2* está ligada a la retracción craneofacial en el síndrome de Down (Arron *et al.*, 2006) y CAM, otro miembro de la señalización  $Ca^{2+}$ , regula la extensión craneofacial del pico en los pinzones de las islas Galápagos (Abzhanov *et al.*, 2006). En relación con WNT, *Wnt5a* también se expresa en los arcos faríngeos 1 y 2, donde se formará la mandíbula (Baranksi *et al.*, 2000) pero aún se desconoce su relación con la vía  $Ca^{2+}$ . Estos datos ayudan a sugerir una

interacción de la vía WNT/Ca<sup>2+</sup> con la extensión de estructuras en otros procesos del desarrollo del esqueleto como sería el caso de la mandíbula.



**Figura 28.** Modelo representativo del papel de WNT5A para promover la formación y mantener la expresión de Sox9 en la DC/PFR. Del lado derecho se muestra un embrión de etapa 26 en proceso de desarrollo donde: en azul se observa el cartílago maduro, en verde la DC/PFR, en rosa oscuro la región competente a WNT5A y en amarillo el tejido mesenquimal indiferenciado. Del lado derecho se muestra un acercamiento al dedo III. Se aprecia como la AER (rojo) libera señales que promueven la activación de la vía WNT/β-catenina en el tejido indiferenciado para reprimir la expresión de Sox9. *Wnt5a*, expresado en la zona indiferenciada, promueve la degradación de β-catenina y a su vez, la activación de NFAT, para formar la región competente (rojo) a señales de TGFβ. Favoreciendo la expresión de Sox9 en la DC/PFR y así mantener el continuo reclutamiento de las células hacia el linaje condrogénico.

## Conclusión

En este trabajo se demostró por primera vez la participación de la señalización WNT/Ca<sup>2+</sup> en la formación de la extremidad embrionaria. Se mostró que las células de la zona indiferenciada, particularmente de la región competente, usan a WNT5A como un factor para promover la liberación de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma y que NFAT aumente, relocalizándose en el núcleo. Esta señalización a través de CaN y NFAT actúa de forma permisiva, para aumentar la respuesta a TGFβ, y así promover la expresión de Sox9 para mantener la diferenciación a cartílago en la DC/PFR del dígito embrionario.

## Perspectivas

- Explorar la expresión de *Fz4*, *Ror2* y *Vangl* en la extremidad embrionaria y buscar si la formación de un dedo ectópico por TGF $\beta$  en el interdígito es capaz de inducir la expresión de estos genes.
- Teñir con FURA 2 AM en la zona indiferenciada del interdígito y colocar WNT5A o SFRP1 para conocer si esta cambia los niveles de calcio intracelular en respuesta.
- Explorar los efectos de WNT5A e inhibidor de CaN y NFAT en la apoptosis del interdígito con técnicas más específicas como TUNEL e inmunohistoquímicas de Caspasa.
- Explorar la respuesta a WNT5A con FURA en otros tejidos embrionarios que respondan a este factor para conocer la posible participación de la vía WNT/Ca<sup>2+</sup>.

## Referencias

- Abarca-Buis, R. F., Bustamante, M., *et al.* (2011). Smad8 is expressed in the anterior necrotic zone: evidence for a role of bone morphogenetic proteins/SMAD signaling in the activation of a molecular cascade that culminates in cell death. *Development, growth & differentiation*, 53(6), 780-792.
- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., & Wrana, J. L. (1997). T $\beta$ RI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27678-27685.
- Aberle, H., Bauer, A., *et al.* (1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo Journal*. 16, 3797–3804.
- Abzhanov, A., Kuo, W. P., *et al.* (2006). The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature* 442(7102), 563-567.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, *et al.* (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16(21): 2813-28.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., *et al.* (2004). Interactions between Sox9 and  $\beta$ -catenin control chondrocyte differentiation. *Gene. Dev.* 18(9), 1072-1087.
- Aono, H. and H. Ide (1988). A gradient of responsiveness to the growth-promoting activity of ZPA (zone of polarizing activity) in the chick limb bud. *Dev Biol* 128(1): 136-41.
- Archer, C. W., G. P. Dowthwaite, *et al.* (2003). "Development of synovial joints." *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2): 144-55.
- Arron, J. R., Winslow, M. *et al.* (2006). NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441(7093), 595-600.

- Attisano, L., Carcamo, J., *et al.* (1993). Identification of human activin and TGF $\beta$  type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, 75(4), 671-680.
- Bernatik, O., Radaszkiewicz, *et al.* (2017). A novel role for the BMP antagonist noggin in sensitizing cells to non-canonical WNT-5a/Ror2/disheveled pathway activation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 47.
- Bilic, J., Huang, Y. L., *et al.* (2007) WNT induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316, 1619–1622.
- Border, W. A., and Ruoslahti, E. (1992). Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *The Journal of clinical investigation*, 90(1), 1-7.
- Boutros, M., Paricio, N., *et al.* (1998) Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell*. 94, 109–118.
- Bradley, E. W., and Drissi, M. H. (2010). WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF- $\kappa$ B pathways. *Mol. Endocrinol.* 24(8), 1581-1593.
- Bradley, E. W., and Drissi, M. H. (2011). WNT5b regulates mesenchymal cell aggregation and chondrocyte differentiation through the planar cell polarity pathway. *Journal of cellular physiology*, 226(6), 1683-1693.
- Brunet, L. J., J. A. McMahon, *et al.* (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280(5368): 1455-7.
- Capdevila, J., Tsukui, T., *et al.* (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol. Cell* 4: 839–849.
- Chen, X., Rubock, M. J., *et al.* (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF $\beta$  signalling. *Nature*, 383(6602), 691.

- Chen, Y., Takeshita, A., *et al.* (1996). Transcriptional regulation by transforming growth factor  $\beta$  of the expression of retinoic acid and retinoid X receptor genes in osteoblastic cells is mediated through AP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31602-31606.
- Chimal-Monroy, J., Montero, J. A., *et al.* (2002). Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass cultures. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 224(3), 314-320.
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., *et al.* (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev. Biol.* 257(2), 292-301.
- Chimal-Monroy, J., Garciadiego-Cazares, *et al.* (2005). Coordination of joint formation and cartilage differentiation in the appendicular skeleton. *Trends Develop Biol*, 1, 47-53.
- Chimal-Monroy, J., Abarca-Buis, R. F., *et al.* (2011). Molecular control of cell differentiation and programmed cell death during digit development. *IUBMB life*, 63(10), 922-929.
- Church, V., Nohno, T., *et al.* (2002). WNT regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 115(24), 4809-4818.
- Cohn, M. J., J. C. Izpisua-Belmonte, *et al.* (1995). Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80(5): 739-46.
- Corda, G., & Sala, A. (2017). Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis*, 6(7), e364-e364.
- Crabtree, G. R., and Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109(2), S67-S79.
- Crossley, P. H., G. Minowada, *et al.* (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84(1): 127-36.

- Datto, M. B., Yu, Y., *et al.* (1995). Functional Analysis of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Responsive Elements in the WAF1/Cip1/p21 Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28623-28628.
- Darwin, Ch. R. (1859). *El origen de las especies*. Reino Unido, John Murray.
- Dealy, C. N., Roth, *et al.* (1993). WNT-5a and WNT-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximo-distal and dorso-ventral axes. *Mech. Develop.* 43(2-3), 175-186.
- De Crombrughe, B., Lefebvre, V., *et al.* (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology*, 19(5), 389-394.
- Degala, S., Williams, R., Zipfel, W., *et al.* (2012). Calcium signaling in response to fluid flow by chondrocytes in 3D alginate culture. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(5), 793-799.
- Delise, A. M. and R. S. Tuan (2002). Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn* 225(2): 195-204.
- Dessau, W., H. von der Mark, *et al.* (1980). Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 57: 51-60.
- De Winter, J. P., ten Dijke, P., *et al.* (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 116(1), 105-114.
- Díaz-Hernández, M. E., Bustamante, M., Galván-Hernandez, C. I., & Chimal-Monroy, J. (2013). *Irx1* and *Irx2* are coordinately expressed and regulated by retinoic acid, TGF $\beta$  and FGF signaling during chick hindlimb development. *PloS one*, 8(3), e58549.
- Dudley, A.T., Ros, M.A., *et al.* (2002). A re-examination of proximo-distal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418: 539–544.

- Dunty Jr, W. C., Zucker, R. M., & Sulik, K. K. (2002). Hindbrain and cranial nerve dysmorphogenesis result from acute maternal ethanol administration. *Developmental neuroscience*, 24(4), 328-342.
- Fanto, M., Weber, U., *et al.* (2000) Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Curr Biol.* 10, 979–988.
- Farquhar, M. G. and G. E. Palade (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17: 375-412.
- Fell, H. B. and R. Canti (1934). Experiments on the Development in vitro of the Avian Knee-Joint. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 116(799): 316-351.
- Fernandez-Teran, M. A., Hinchliffe, J. R., *et al.* (2006). Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Developmental dynamics*, 235(9), 2521-2537.
- Francis, P. H., Richardson, M. K., *et al.* (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*, 120(1), 209-218.
- Franzen, P., ten Dijke, P., *et al.* (1993). Cloning of a TGF $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF $\beta$  type II receptor. *Cell*, 75(4), 681-692.
- Gañan, Y., D. Macias, *et al.* (1996). Role of TGF betas and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122(8): 2349-57.
- Gao, B., Song, H., *et al.* (2011). WNT signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev. Cell* 20(2), 163-176.

- Garciadiego-Cazares, D., C. Rosales, *et al.* (2004). Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development* 131(19): 4735-42.
- García-Sáinz, J. A., and Torres-Padilla, M. E. (1999). Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing  $\alpha$ 1d-adrenoceptors. *FEBS letters*, 443(3), 277-281.
- Gaur, T., Rich, L., *et al.* (2006). Secreted frizzled related protein 1 regulates WNT signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. *J. Cell. Physiol.* 208(1), 87-96.
- Gilbert, S. y Barresi M. J. F. (2016). *Biología del Desarrollo*. 11ª Ed. Massachusetts E. U., Sinauer Associates.
- Glinka, A., Wu, W., *et al.* (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391(6665), 357.
- Goedegebuure, S. A., and Hazewinkel, H. A. W. (1986). Morphological findings in young dogs chronically fed a diet containing excess calcium. *Veterinary pathology*, 23(5), 594-605.
- Griffith, D. L., Keck, P. C., *et al.* (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 878-883.
- Gros, J., Hu, J. K. H., *et al.* (2010). WNT5A/JNK and FGF/MAPK pathways regulate the cellular events shaping the vertebrate limb bud. *Curr. Biol.* 20(22), 1993-2002.
- Grotewold, L., Theil, T., *et al.* (1999). Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development. *Mech. of dev.* 89(1), 151-153.
- Grotewold, L., Plum, M., *et al.* (2001). Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech. of dev.* 100(2), 327-330.

- Grumolato, L., Liu, G., *et al.* (2010). Canonical and noncanonical WNTs use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Gene. Dev.* 24(22), 2517-2530.
- Hall, B. K. (2005). *Bones and Cartilage*. San Diego California E. U., Elsevier.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951." *Dev Dyn* 195(4): 231-72.
- Harrison, R. (1918). Experiments on the development of the fore limb of *Amblystoma*, a self-differentiating equipotential system. *The Journal of Experimental Zoology* 5(2): 413-461.
- Hartmann, C., and Tabin, C. J. (2000). Dual roles of WNT signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, 127(14), 3141-3159.
- Hartmann, C. and Tabin, C. J. (2001). WNT-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 104(3): 341-51.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., *et al.* (2000) Silberblick/WNT11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*. 405, 76–81.
- Hikasa, H., Shibata, M. I., *et al.* (2002) The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via WNT signaling. *Development*. 129, 5227–5239.
- Hildebrand, M. (1982). *Anatomía y Embriología de Vertebrados*. Mexico, DF, Limusa.
- Hill, T. P., Taketo, M. M., *et al.* (2006). Multiple roles of mesenchymal  $\beta$ -catenin during murine limb patterning. *Development* 133(7), 1219-1229.
- Hinchliffe, J. R., & Ede, D. A. (1973). Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless (*ws*) chick embryos. *Development*, 30(3), 753-772.

- Hinchliffe, J. R. (1980). The development of the vertebrate limb. Estados Unidos, NY, Clarendon Press-Oxford.
- Holder, N. (1977). An experimental investigation into early development of the chick elbow joint. *J. Embryol. exp. Morph.* 39, 115-127.
- Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., *et al.* (1999). A new secreted protein that binds to WNT proteins and inhibits their activities. *Nature*, 398(6726), 431.
- Imamura, T., Takase, M., *et al.* (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF $\beta$  superfamily. *Nature*, 389(6651), 622.
- Karsenty, G. and E. F. Wagner (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2(4): 389-406.
- Kawakami, Y., Wada, N., *et al.* (1999). Involvement of WNT-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.* 41(1), 29-40.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the WNT signalling pathway. *Journal of cell science*, 116(13), 2627-2634.
- Kilian, B., Mansukoski, H., *et al.* (2003) The role of Ppt/WNT5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev.* 120, 467–476.
- King, J. A., P. C. Marker, *et al.* (1994). "BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice." *Dev Biol* 166(1): 112-22.
- Kosher, R. A., M. P. Savage, *et al.* (1981). A gradation of hyaluronate accumulation along the proximo-distal axis of the embryonic chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol* 63: 85-98.
- Koyama, E., Young, B., *et al.* (2007). Conditional Kif3a ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis. *Development*, 134(11), 2159-2169.

- Kretzschmar, M., Liu, F., *et al.* (1997). The TGF $\beta$  family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes & development*, 11(8), 984-995.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., *et al.* (2000) Ca (2+)/calmodulindependent protein kinase II is stimulated by WNT and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem.* 275, 12701–12711.
- Kulyk, W. M., W. B. Upholt, *et al.* (1989). Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development* 106(3): 449-55.
- Lagna, G., Hata, A., *et al.* (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF $\beta$  signalling pathways. *Nature*, 383(6603), 832.
- Lefebvre, V., W. Huang, *et al.* (1997). "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." *Mol Cell Biol* 17(4): 2336-46.
- Liu, F., Hata, A., *et al.* (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*, 381(6583), 620.
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., *et al.* (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF $\beta$  receptor system. *Cell*, 67(4), 785-795.
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., *et al.* (2011). Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limb. *PLoS One*, 6(9), e24546.
- Macias, D., Ganan, Y., *et al.* (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*, 124(6), 1109-1117.

- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., & Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 87(7), 1215-1224.
- Maleski, M. P., and Knudson, C. B. (1996). Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis. *Experimental cell research*, 225(1), 55-66.
- Marigo, V., Volpin, D., *et al.* (1994). Identification of a TGF $\beta$  responsive element in the human elastin promoter. *Biochemical and biophysical research communications*, 199(2), 1049-1056.
- Massagué, J. (1996). TGF $\beta$  signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*, 85(7), 947-950.
- Massagué, J. (1998). TGF $\beta$  signal transduction. *Annual Reviews on Biochemistry*. 753-791.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(3), 169.
- Matta, C., Fodor, J., *et al.* (2008). Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell calcium*, 44(3), 310-323.
- Merino, R., Gañan, Y., *et al.* (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGF $\beta$ s, and noggin through BMP signaling. *Dev. Biol.* 200(1), 35-45.
- McAllister, K. A., Grogg, K. M., *et al.* (1994). Endoglin, a TGF $\beta$  binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature genetics*, 8(4), 345.
- Mikels, A. J., and Nusse, R. (2006). WNTs as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 25(57), 7461.

- Montero, J. A., Gañan, Y., *et al.* (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* 128(11), 2075-2084.
- Montero, J. A., Zuzarte-Luis, V., *et al.* (2007). Role of RhoC in digit morphogenesis during limb development. *Developmental biology*, 303(1), 325-335.
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., *et al.* (2008). Activin/TGF $\beta$  and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Developmental biology*, 321(2), 343-356.
- Montero, J. A., & Hurlé, J. M. (2010). Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis*, 15(3), 365-375.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., *et al.* (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental cell*, 1(3), 423-434.
- Nakao, A., Afrakhte, M., *et al.* (1997). Identification of Smad7, a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF $\beta$  signalling. *Nature*, 389(6651), 631.
- Nakao, A., Imamura, T., *et al.* (1997). TGF $\beta$  receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *The EMBO journal*, 16(17), 5353-5362.
- Nishita, M., Itsukushima, S., (2010). Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Molecular and cellular biology*, 30(14), 3610-3619.
- Niswander, L., S. Jeffrey, *et al.* (1994). A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371(6498): 609-12.
- Oishi, I., Suzuki, H., *et al.* (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(7), 645-654.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., *et al.* (1999). Silencing of TGF $\beta$  signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401(6752), 480.

- Ordahl, C. P., & Le Douarin, N. M. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*, 114(2), 339-353
- Ozawa, M., Ringwald, M., & Kemler, R. (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(11), 4246-4250.
- Person, A. D., Beiraghi, S., *et al.* (2010). WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev. Dynam.* 239(1), 327-337.
- Piccolo, S., Sasai, Y., *et al.* (1996). Dorso-ventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, 86(4), 589-598.
- Pizette, S. and L. Niswander (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* 219(2): 237-49.
- Price, O. T., Lau, C., & Zucker, R. M. (2003). Quantitative fluorescence of 5-FU-treated fetal rat limbs using confocal laser scanning microscopy and Lysotracker Red. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 53(1), 9-21.
- Ritzenthaler, J. D., Goldstein, R. H., *et al.* (1993). Regulation of the alpha 1 (I) collagen promoter via a transforming growth factor-beta activation element. *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), 13625-13631.
- Rudnicki, J. A. and A. M. Brown (1997). Inhibition of chondrogenesis by WNT gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol* 185(1): 104-18.
- Rodriguez-Guzman, M., Montero, J. A., *et al.* (2007). Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic acid signaling. *Developmental biology*, 302(1), 267-280.

- Saneyoshi, T., Kume, S., *et al.* (2002) The WNT/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature*. 417, 295–299.
- Satoh, W., Gotoh, T., *et al.* (2006). *Sfrp1* and *Sfrp2* regulate antero-posterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133(6), 989-999.
- Saunders, J. W. (1948). The próximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool. Part A* 108(3), 363-403.
- Saunders Jr, J. W., Gasseling, M. T., *et al.* (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Developmental biology*, 5(1), 147-178.
- Savage, C., Das, P., *et al.* (1996). *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 790-794.
- Searls, R. L. (1965). An autoradiographic study of the uptake of <sup>35</sup>S-sulfate during the differentiation of limb bud cartilage. *Developmental biology*, 11(2), 155-168.
- Searls, R. L., S. R. Hilfer, *et al.* (1972). An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud. *Dev Biol* 28(1): 123-37.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., *et al.* (1995). Genetic characterization and cloning of mothers against *dpp*, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 139(3), 1347-1358.
- Sheldahl, L.C., Park, M., *et al.* (1999) Protein kinase C is differentially stimulated by WNT and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* . 9 , 695–698.
- Slack, J. M. K (2013). *Essential Developmental Biology*. 3<sup>a</sup>. Ed. Sussex R. U., Wiley-Blackwell.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., *et al.* (2001). The transcription factors *L-Sox5* and *Sox6* are essential for cartilage formation. *Developmental cell*, 1(2), 277-290.

- Solursh, M., Singley, C. T., *et al.* (1981). The influence of epithelia on cartilage and loose connective tissue formation by limb mesenchyme cultures. *Dev. Biol.* 86(2), 471-482.
- Storm, E. E. and D. M. Kingsley (1996). Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122(12): 3969-79.
- Sulik, K. K., Dehart, D. B., Johnson, C. S., Ellis, S. L., Chen, S. Y., Dunty Jr, W. C., & Zucker, R. M. (2001). Programmed cell death in extraocular muscle tendon/sclera precursors. *Mol Vis*, 7, 184-191.
- Summerbell, D., Lewis, J. H., *et al.* (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature*, 244(5417), 492-496.
- Sun, X., Mariani, F.V., *et al.* (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418: 501–508.
- Suzuki, T., Hasso, S. M., *et al.* (2008). Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4185-4190.
- Tabin, C., and Wolpert, L. (2007). Rethinking the proximo-distal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes and development*, 21(12), 1433-1442.
- ten Berge, D., Brugmann, S. A., *et al.* (2008). WNT and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development* 135(19), 3247-3257.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., *et al.* (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *Journal of Biological Chemistry*, 269(25), 16985-16988.

- Thorogood, P. V. and J. R. Hinchliffe (1975). An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol* 33(3): 581-606.
- Tomita, M., Reinhold, M. I., *et al.* (2002). Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* 277(44), 42214-42218.
- Topol, L., Jiang, X., *et al.* (2003). WNT-5a inhibits the canonical WNT pathway by promoting GSK-3-independent  $\beta$ -catenin degradation. *J. Cell. Biol.* 162(5), 899-908.
- Topol, L., Chen, W., *et al.* (2009). Sox9 inhibits WNT signaling by promoting  $\beta$ -catenin phosphorylation in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3323-3333.
- Tuan, R. S., and Lynch, M. H. (1983). Effect of experimentally induced calcium deficiency on the developmental expression of collagen types in chick embryonic skeleton. *Developmental biology*, 100(2), 374-386.
- Tufan, A. C., and Tuan, R. S. (2001). WNT regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *The FASEB Journal*, 15(8), 1436-1438.
- Von der Mark, K., H. von der Mark, *et al.* (1976). Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. II. Localization of type I and type II collagen during long bone development. *Dev Biol* 53(2): 153-70.
- Wang, B., Sinha, T., *et al.* (2010). Disruption of PCP signaling causes limb morphogenesis and skeletal defects and may underlie Robinow syndrome and brachydactyly type B. *Hum. Mol. Genet.* 20(2), 271-285.
- Witte, F., Dokas, J., *et al.* (2009). Comprehensive expression analysis of all WNT genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr. Patterns* 9(4), 215-223.

- Witte, F., Chan, D., *et al.* (2010). Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) and Indian hedgehog regulate digit outgrowth mediated by the phalanx-forming region. *P. Natl. Acad. Sci.* 107(32), 14211-14216.
- Wolpert, L., (2002). The progress zone model for specifying positional information. *Int J Dev Biol.* 46, 869-70.
- Wrana, J. L., Attisano, L., *et al.* (1994). Mechanism of activation of the TGF $\beta$  receptor. *Nature*,370(6488), 341.
- Yamaguchi, T. P., Bradley, A., *et al.* (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126(6), 1211-1223.
- Yang, Y., Topol, L., *et al.* (2003). Wnt5a and WNT5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, 130(5), 1003-1015.
- Yokouchi, Y., Nakazato, S., *et al.* (1995). Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes & Dev.* 9: 2509– 2522.
- Zakany, J., & Duboule, D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Current opinion in genetics & development*, 17(4), 359-366.
- Zeng, X., Tamai, K., *et al.* (2005) A dual-kinase mechanism for WNT co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877.
- Zhao, Q. I., Eberspaecher, H., *et al.* (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental dynamics*, 209(4), 377-386.
- Zhu, S., Liu, L., *et al.* (2006) RhoA acts downstream of WNT5 and WNT11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal.* 18, 359–372.

- Zimmerman, L. B., De Jesús-Escobar, J. M., *et al.* (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 86(4), 599-606.
- Zou, H., & Niswander, L. (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science*, 272(5262), 738-741.
- Zou, H., R. Wieser, *et al.* (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 11(17): 2191-203.
- Zucker, R. M., Hunter, S., & Rogers, J. M. (1998). Confocal laser scanning microscopy of apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 33(3), 348-354.
- Zuzarte-Luis, V., & Hurle, J. M. (2004). Programmed cell death in the developing limb. *International Journal of Developmental Biology*, 46(7), 871-876.