



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

**Análisis del perfil de microRNA en la eliminación
de los progenitores esqueléticos de los espacios
interdigitales embrionarios**

Beatriz Inmaculada García-Riart Monzón

Santander, 2017



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

**Análisis del perfil de microRNA en la eliminación
de los progenitores esqueléticos de los espacios
interdigitales embrionarios**

**Tesis Doctoral presentada por Beatriz Inmaculada García-Riart Monzón
para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Cantabria
Santander, Abril de 2017**



DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y BIOLOGIA
CELULAR
Facultad de Medicina
Cardenal Herrera Oria, s/n
39011 Santander (España)
☎ 942 201 920 – Fax 942 201 903

El profesor **Dr. Juan Mario Hurlé González**, Catedrático de Anatomía Humana del Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Universidad de Cantabria. El profesor **Dr. Juan Antonio Montero Simón** del Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Universidad de Cantabria.

CERTIFICAMOS: que **Doña Beatriz Inmaculada García-Riart Monzón** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado:

“Análisis del perfil de los microRNA en la eliminación de los progenitores esqueléticos de los espacios interdigitales embrionarios”.

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander a 4 de Abril de 2017

Fdo. Dr. J.M. Hurlé González

Fdo. Dr. J.A. Montero Simón

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Ayuda predoctoral de formación de personal investigador (FPI) BES-2012-059674 asociada al proyecto de investigación BFU2011-24169. Ministerio de Economía y Competitividad.
- Proyecto de investigación BFU2014-54026P. Ministerio de Economía y Competitividad.

A mi familia y amigos.

A Raisa.

Quisiera aprovechar este apartado para agradecer encarecidamente, en primer lugar, a los profesores Juan M. Hurlé y Juan Antonio Montero por darme la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora bajo su dirección y darles las gracias también por su disposición, tiempo y amabilidad.

A las técnicas de laboratorio Sonia Pérez, Montserrat Fernández y Susana Dawalibi, por su constante ayuda durante estos años, la cual ha supuesto un importante apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la Dra. María del Amor Hurlé y a su equipo por facilitarme tanto material como soporte durante este proceso.

Quisiera también hacer una mención especial al Dr. Carlos Ignacio Lorda y a la futura Dra. Cristina Sánchez, ya que sin vuestra inmensa aportación estas páginas no conformarían hoy una Tesis.

Por último, quiero también mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han colaborado en la realización de este trabajo.

Si guardas en tu puesto la cabeza tranquila,
cuando todo a tu lado es cabeza perdida.
Si tienes en ti mismo una fe que te niegan
y no desprecias nunca las dudas que ellos tengan.
Si esperas en tu puesto, sin fatiga en la espera.
Si engañado, no engañas.
Si no buscas más odio, que el odio que te tengan.
Si eres bueno, y no finges ser mejor de lo que eres.
Si al hablar no exageras, lo que sabes y quieres.
Si sueñas y los sueños no te hacen su esclavo.
Si piensas y rechazas lo que piensas en vano.
Si alcanzas el TRIUNFO o llega tu DERROTA,
y a los dos impostores les tratas de igual forma.
Si logras que se sepa la verdad que has hablado,
a pesar del sofisma del Orbe encanallado.
Si vuelves al comienzo de la obra perdida,
aunque esta obra sea la de toda tu vida.
Si arriesgas de un golpe y lleno de alegría,
tus ganancias de siempre a la suerte de un día,
y pierdes, y te lanzas de nuevo a la pelea,
sin decir nada a nadie lo que eres, ni lo que eras.
Si logras que los nervios y el corazón te asistan,
aún después de su fuga, en tu cuerpo en fatiga,
y se agarren contigo, cuando no quede nada,
porque tú lo desees, lo quieres y mandas.
Si hablas con el pueblo, y guardas la virtud.
Si marchas junto a Reyes, con tu paso y tu luz.
Si nadie que te hiera, llega a hacerte la herida.
Si todos te reclaman, y ninguno te precisa.
Si llenas el minuto inolvidable y cierto,
de sesenta segundos, que te llevan al cielo.
TODO lo de esta Tierra será de tu dominio,
Y mucho más aún ...

¡Serás un HOMBRE, hijo mío! (Kipling., 1910)

SUMARIO

•	ABREVIATURAS	1
•	INTRODUCCIÓN	5
1.	Aspectos revisados en la presente memoria	7
2.	Estado actual del problema	7
2.1.	Terminología	9
2.2.	Biogénesis	10
2.3.	Reconocimiento de los mRNA dianas	14
2.4.	Predicción de los mRNA diana mediante programas bioinformáticos	15
2.5.	Mecanismos de regulación	16
2.6.	MicroRNA circulantes	17
2.7.	MicroRNA como biomarcadores	18
3.	MicroRNA en la diferenciación de los tejidos esqueléticos	19
3.1.	MicroRNA implicados en la condrogénesis	20
3.2.	MicroRNA implicados en la tenogénesis	30
3.3.	MicroRNA implicados en senescencia y apoptosis durante el desarrollo embrionario	36
4.	Formación de la extremidad	45
4.1.	Características generales	45
4.2.	Desarrollo	47
•	OBJETIVOS	51
•	MATERIAL Y MÉTODOS	55
1.	Modelos animales	57
2.	Extracción del tercer interdígito de la pata del embrión de pollo y de pato	57

3.	Identificación de microRNA	58
3.1.	Secuenciación masiva de microRNA	58
4.	Cultivos celulares	59
4.1.	Cultivos de alta densidad o micromasas	59
4.2.	Cultivos de baja densidad o monocapa	60
5.	Tinciones	60
5.1.	Azul Alcian	60
5.2.	Rojo Neutro	61
6.	Tratamientos de cultivos de micromasas	61
6.1.	Factores de crecimiento	61
6.2.	Reguladores de los factores de crecimiento	61
6.3.	Estrés oxidativo	62
7.	Electroporación Pre-miR/Anti-miR	62
8.	Extracción del RNA total	63
9.	Transcripción Reversa (RT)	65
9.1.	Transcripción Reversa de microRNA (miRT)	65
9.2.	Transcripción reversa de RNA	68
10.	qPCR-RT	69
10.1.	TaqMan qPCR-RT	69
10.2.	SYBR Green qPCR-RT	72
11.	Citometría de flujo	76
•	RESULTADOS	77
1.	Planteamiento	79
2.	Secuenciación	79
2.1.	MicroRNA altamente expresados en el interdígito	82
2.2.	Análisis de las secuencias no caracterizadas	90
2.3.	Validación de la secuenciación de RNA	91
3.	Análisis funcional de miR-451 y miR-21	100
3.1.	Análisis por citometría de flujo	101
3.2.	Patrón de regulación génica de los microRNA seleccionados	102

3.3.	Regulación de miR-21 y miR-451 en los cultivos celulares tras diferentes tratamientos	106
•	DISCUSIÓN	109
1.	MicroRNA regulados positivamente durante la regresión del tejido	114
2.	MicroRNA regulados negativamente durante la regresión del tejido	116
3.	MicroRNA moduladores de la señalización por TGFβ	118
4.	MicroRNA implicados en la maduración de macrófagos y fagocitosis	120
5.	Análisis funcional de los microRNA interdigitales	121
•	CONCLUSIONES	125
•	BIBLIOGRAFÍA	129
•	ARTÍCULOS	167

ABREVIATURAS

μL	Microlítrios
μM	Micromolar
3'	Cadena 3 prima
5'	Cadena 5 prima
AER	cresta ectodérmica apical (“Apical Ectodermal Ridge”)
BMP	proteína morfogenética del hueso (“Bone Morfogenetic Protein”)
cDNA	DNA complementario (“complementary DeoxyriboNucleic Acid”)
DEPC	“DiEthylPiroCarbonate”
DGCR8	“DiGeorge Syndrome Chromosomal Región 8”
DMEM	“Dublecco’s Modified Eagle Medium”
DNA	Ácido DesoxirriboNucleico
dNTP	“Desoxyribonucleotide triphosphate”
ECM	matriz extracelular (“Extracellular Matrix”)
FGF	factor de crecimiento fibroblástico (“Fibroblast Growth Factor”)
gga	<i>Gallus gallus</i>
h	Horas
HDL	lipoproteína de alta densidad (“High Density Lipoprotein”)
HH	Hamburger y Hamilton (estadios de desarrollo embrionario)
HR	Humedad Relativa
hsa	<i>Homo sapiens sapiens</i>
INZ	zonas necróticas interdigitales (“Interdigital Necrotic Zones”)
KEGG	“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
mg	Miligramo
miR	MicroRNA
ml	Mililitros
MMP	Metaloproteinasas
mmu	<i>Mus musculus</i>
mRNA	Ácido RiboNucleico mensajero
°C	Grados centígrados
PBS	tampón fosfato salino (“Phosphate-Buffered Saline Solution”)
PI	Posincubación
PZ	zona de progreso (“Progress Zone”)

qPCR	PCR cuantitativa (“quantitative PCR”)
RISC	complejo inductor de silenciamiento del RNA (“RNA Induced Silencing Complex”)
RNA	Ácido RiboNucleico
RNasa	Ribonucleasa
RPM	lecturas por millón (“Reads Per Million”)
RT	transcripción reversa de la polimerasa (“Reverse Transcription”)
SASP	fenotipo asociado a senescencia (“Senescence-Associated Secretory Phenotype”)
SYBR	“ N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine”
TGFβ	factor de crecimiento transformante β (“Transforming Growth Factor β”)
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular (“Vascular Endothelial Growth Factor”)



INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS REVISADOS EN LA PRESENTE MEMORIA

Dado que el tejido interdigital que analizamos en esta Tesis contiene células progenitoras de cartílago y tendón destinadas a morir, revisaremos en este apartado, además de aspectos generales de los microRNA, su papel en la diferenciación de los tejidos mencionados, así como su implicación en procesos degenerativos.

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

El "dogma central" de la biología molecular moderna, que ha proporcionado el principio rector para la transferencia de la información genómica en la estructura y función del organismo, implica primero la transcripción de ácido desoxirribonucleico (DNA) en ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y a continuación, la traducción del mRNA en proteínas (Crick, 1970).

El hallazgo de los microRNA supuso un nuevo descubrimiento en la regulación de la expresión génica, se vio que más allá de no codificar proteínas producían la degradación de los mRNA y por lo tanto la inhibición de la traducción a proteínas. (Sun et al., 2010).

La primera vez que se describió el fenómeno de silenciamiento de genes fue en 1990, por el equipo de Richard Jorgensen, en la Universidad de California. Este grupo diseñó experimentos que consistían en sobreexpresar el gen *Chalcone synthase* (CHS), responsable del color púrpura de los pétalos de las Petunias. Se observó, sin embargo, que cuando se introducía una copia extra del gen, en lugar de incrementar su coloración, las flores adquirían colores variados e incluso se despigmentaban (42% color blanco). Este suceso, recibió el nombre de "cosupresión" (Napoli et al., 1990).

En 1992, Romano y Macino en la Universidad de Roma, hallaron un fenómeno similar en el hongo *Neurospora Crassa*. Al introducir los genes *albino-1* (*al-1*) y *albino-3* (*al-3*), que participan en la síntesis de carotenoides que dan lugar a la pigmentación naranja del hongo, estos sufrían una rápida degradación de los genes endógenos dando lugar a ejemplares albinos. A este fenómeno lo denominaron "Quelling" (represión; Romano y Macino, 1992).

El siguiente gran avance se produjo en el laboratorio de Victor Ambros en Harvard. Rosalind C. Lee y Rhonda L. Feinbaum observaron que el gen *lin-4* que regula la

actividad de *lin-14*, que controla el desarrollo larvario en *C.elegans*, no codificaba para proteínas, pero si daba lugar a un par de pequeños RNA (Lee et al., 1993).

En 1998, el grupo del Dr. Craig Mello de la Universidad de Carnegie, demostró que las interferencias postranscripcionales genéticas producidas por el RNA eran más eficaces cuando este se introducía en forma de doble cadena. El Dr. Andrew Fire llamó a este fenómeno “RNA de interferencia” o “RNAi”, nombre que conserva hasta la fecha (Fire et al., 1998).

Actualmente sabemos que el fenómeno de “silenciamiento genético postranscripcional”, la represión génica en plantas y hongos junto con el fenómeno de RNAi en animales, son aspectos del mismo proceso (Agrawal et al., 2003).

La importancia del papel de los microRNA en el desarrollo es destacada ya que comprende aproximadamente el 1% de los genes en animales. Este fenómeno está conservado a lo largo de la evolución, presentándose en organismos tan variados y distantes como levaduras, plantas, hongos, insectos, nematodos, y vertebrados incluyendo los mamíferos (Pasquinelli et al., 2000; Lim et al., 2003; Ambros et al., 2003).

Los microRNA son RNA no codificantes, de doble cadena y unos 22nt de longitud que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional.

Los microRNA están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos, tanto a nivel del desarrollo como en animales adultos participando en el control de la división celular, proliferación, diferenciación, apoptosis y también en múltiples estados patológicos.

La biogénesis de microRNA está bajo estrecho control temporal y espacial, y su desregulación está asociada con muchas enfermedades humanas como por ejemplo enfermedades del corazón, metabólicas, degenerativas y cáncer (Newman y Hammond, 2010).

En los metazoos, los microRNA están producidos por dos proteínas RNasa III, Drosha, que actúa en el núcleo y Dicer, que actúa en el citoplasma.

Su biogénesis está regulada a muchos niveles. Además, en la actualidad, están identificándose nuevas vías de biogénesis no canónica, alguna de las cuales son independientes de Drosha o Dicer (Ha et al., 2014).

En lo referente a su presentación en las células, algunos microRNA aparecen de forma solitaria y se expresan bajo control de sus promotores y secuencias reguladoras. Otros se agrupan en conjuntos (“clusters”), formados por microRNA localizados en regiones próximas del genoma. Cuando los grupos de microRNA tienen una secuencia similar, todos ellos pueden contribuir en la regulación de sus mRNA diana. Siguiendo esta línea, también hallamos diferencias en cuanto a su abundancia en las células, llegando algunos incluso hasta valores de 10.000 moléculas por célula, mientras que otros, mucho menos abundantes, son únicamente detectables por hibridación de las muestras de RNA total (Ambros, 2004).

2.1. Terminología

La terminología empleada para describir los microRNA incluye diversos apartados:

- El prefijo “miR” es la nomenclatura principal de los microRNA maduros, ya que estos durante su biogénesis sufren un proceso de transformación y maduración, denominándose primero pri-miR, luego, pre-miR y finalmente miR.
- La numeración de los microRNA, que es la forma de nominarlos, viene dada según el orden en el cual el miR fue secuenciado.
- Para diferenciar los diferentes miR entre especies se usan las tres letras específicas de la nomenclatura de las especies, por ejemplo: pollo: *Gallus gallus* (gga), humano: *Homo sapiens* (hsa), ratón: *Mus musculus* (mmu).
- En la producción de los microRNA se produce inicialmente una secuencia de RNA de doble cadena y no es hasta que ésta se acopla en el complejo RISC (ver más adelante) cuando una de las cadenas se descarta y degrada. Esta cadena se denomina “cadena pasajera” y se identifica mediante un “*” (miR*), la otra cadena ensamblada en RISC, recibe el nombre de “cadena guía” y no lleva ningún identificador específico (miR). Cuando los datos son insuficientes para determinar cuál es la secuencia guía y la pasajera, se les denomina miR-142-5p (para la hebra -5p) y miR-142-3p (en el caso de la hebra -3p).

- Otra forma, un poco más anticuada de referirse a las diferentes cadenas, aunque usada en algunos casos, es la ejemplificada aquí por miR-142-s, para la cadena 5' y miR-142-as, para la cadena 3' (miRbase, Griffiths-Jones et al., 2006).
- El sufijo -1 y -2 etc. se refiere a pre-miR que dan lugar a idénticos microRNA, pero que están localizados en diferentes partes del genoma. También podemos encontrar letras (a, b, c) que son añadidas cuando los microRNA poseen secuencias casi idénticas, solo diferenciables por uno o dos nucleótidos.

2.2. Biogénesis

El proceso de producción de microRNA puede describirse, de forma resumida, en dos pasos que implican a dos enzimas ribonucleasas endonucleasas III, Drosha y Dicer, que catalizan la hidrólisis de los microRNA en el núcleo y posteriormente en el citoplasma (2 y 4 respectivamente en la figura 1).

Los microRNA se transcriben a partir de diferentes zonas del genoma; en primer lugar se generan moléculas precursoras denominadas microRNA primarios (pri-miRNA), que son procesados en moléculas más sencillas en el núcleo celular dando lugar a los precursores de los microRNA (pre-miRNA), que subsecuentemente darán lugar a una doble hebra de microRNA. La doble hebra se separa originando el microRNA maduro que se une por complementariedad de bases a su mRNA diana, y dependiendo de si esta complementariedad es perfecta o no se producirá su degradación, o bien la represión de su transcripción.

Obviamente, algunos detalles del proceso de biogénesis requieren ser analizados con más detalle.

La vía canónica de la biogénesis de los microRNA se inicia a partir de la transcripción, por parte de la polimerasa II del pri-miRNA (nº 1 en la figura 1; Bartel et al., 2004, Cai et al., 2004).

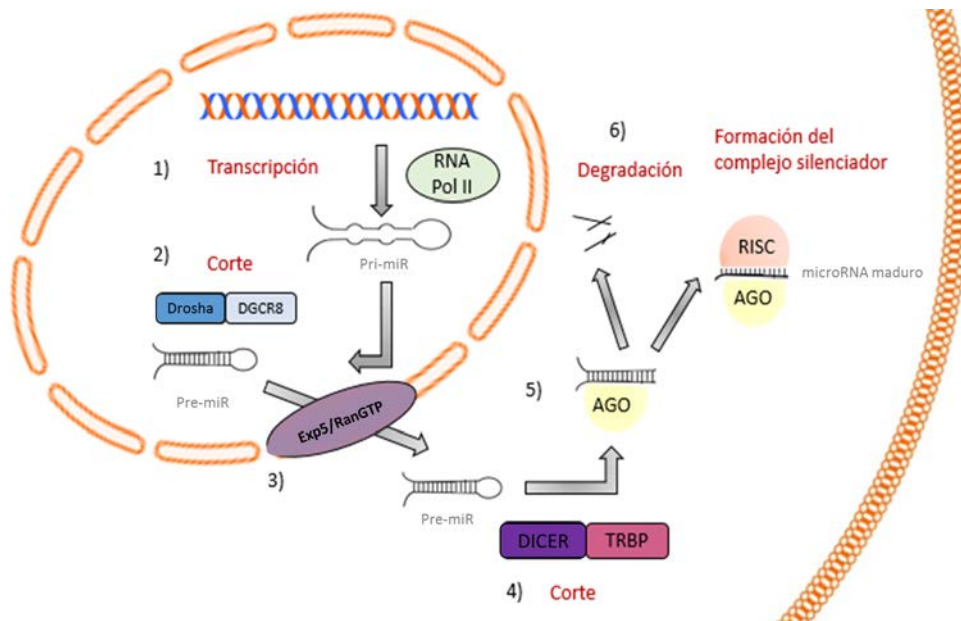


Figura 1: esquematización de la vía canónica de procesamiento de los microRNA (modificado de Winter et al., 2009).

Se ha observado que la ruta de procesamiento de los microRNA está conservada entre especies. 1) La ruta canónica de procesamiento incluye la producción de los transcritos primarios denominados pri-miRNA a partir de la RNasa polimerasa II y su 2) escisión por el complejo microprocesador formado por Drosha y DGCR8 en el núcleo. 3) El producto resultante es el pre-miRNA, que es exportado desde el núcleo por la Exportina-5-Ran-GTP. 4) En el citoplasma, la RNasa DICER junto con la proteína de unión TRBP corta el bucle del pre-miRNA 5) dando lugar a una doble hebra de RNA con la longitud característica de la forma madura. 6) La cadena funcional, la cadena guía, se acopla al complejo silenciador “RISC” junto a una proteína de la familia Argonauto (Ago2), este complejo será el encargado de producir la degradación del mRNA, la represión de la traducción o bien su deanonilación, mientras que la otra cadena, la pasajera, será degradada.

Los pri-miRNA, tal como podemos observar en la figura 2, adoptan una estructura de horquilla imperfecta. Están compuestos por tres bucles helicoidales flanqueados por segmentos de RNA de cadena sencilla en la base (segmentos basales), con un extremo 5' y una cola de polyA, además de un bucle apical que determina el lugar de corte (Cai et al., 2004; Han et al., 2006; Zeng y Cullen, 2005; Zeng et al., 2005) por la enzima RNasaIII Drosha (Lee et al., 2003).

Drosha se encuentra unida al cofactor DGCR8; las funciones del cofactor DGCR8, integrante del complejo microprocesador, son las de reconocimiento de sustrato y de guía de la enzima durante el proceso de escisión del pre-miR.

Drosha escinde, aproximadamente, un bucle helicoidal de 11 pares de bases, contando desde el segmento basal del pri-miRNA, y dos bucles helicoidales con 22 pares de bases de distancia a partir del bucle apical, tal como podemos observar en el número 2 en la figura 1 y esquematizado, de forma más precisa, en la figura 2 (Lee et al., 2003; Han et al., 2006).

Este primer corte produce el pre-miRNA de unos 65nt con forma de horquilla con un final 3' y un grupo fosfato en el extremo 5'. El pre-miR, se une a la Exportina 5 (Exp5; miembro de la familia proteica de las carioferinas; Denli et al., 2004; Lund et al., 2004) que requiere RanGTP — una proteína G monomérica implicada en el tráfico de péptidos y proteínas a través de la envoltura nuclear—, para que su unión al pre-miRNA sea eficaz (nº 3 en la figura 1; Gwizdek et al., 2003) y este pueda ser transportado al citoplasma.

Una vez transportado al citoplasma celular, a través de los poros nucleares, RanGTP se hidroliza a RanGDP liberando el pre-miR en el citoplasma (Kehlenbach et al., 1999).

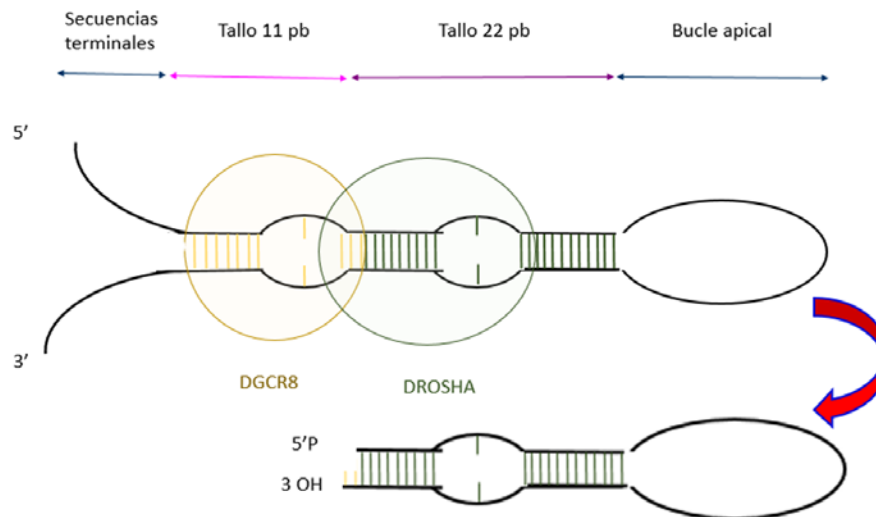


Figura 2: procesamiento del pri-miRNA por parte del complejo microprocesador.

En el citoplasma la otra ribonucleasa endonucleasa III Dicer, es la encargada del procesamiento final de los pre-miR.

Dicer se encuentra presente en todos los seres eucariotas estudiados hasta la fecha (menos en las levaduras) y está compuesto por múltiples dominios que incluyen un dominio DExH / RNA DEAH helicasa / ATPasa, un dominio DUF (por sus iniciales en inglés, domain of unknown function; Kruse et al., 2016), un dominio PAZ (encargado del reconocimiento del RNA), dos dominios RNasaIII (a y b) y por último, un dominio de unión de RNA de doble cadena (dsRBD).

Los dominios RNasaIII y dsRBD son los encargados principales de la unión y del corte del pre-miRNA (figura 3; Zamore et al., 2000; Lau et al., 2012).

Cuando el dominio PAZ reconoce la doble cadena de RNA, Dicer corta el bucle apical del microRNA dando lugar a una doble cadena de RNA de unos 22 nucleótidos de longitud (Lau et al., 2012). Esta doble cadena de RNA es captada y acoplada al complejo RISC por una proteína de la familia Argonauta.

Las proteínas Argonauta, componentes principales de RISC, están formadas por 4 dominios comunes: N, PAZ, MID y PIWI, encargados del anclaje de la cadena guía (nº 4 y 5 en la figura 1; Schirle et al., 2012; Elkayam et al., 2012).

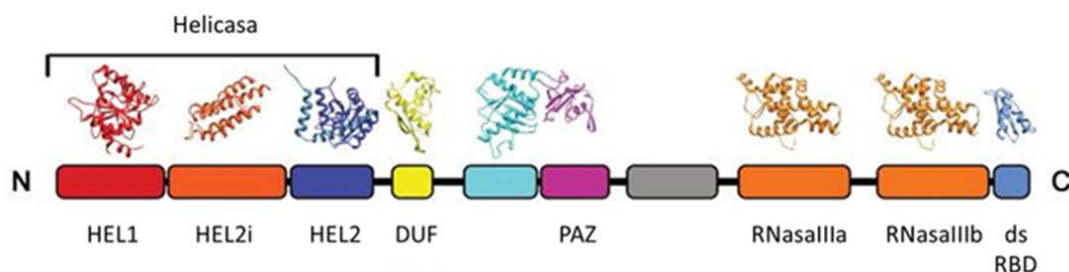


Figura 3: arquitectura de Dicer (modificado de Lau et al., 2012).

En humanos están descritas 4 proteínas Argonauta, AGO1, AGO3, AGO4, con capacidad para reconocer los mRNA diana y AGO2 con capacidad de escisión de la doble cadena de RNA en dos cadenas simples (Nakanishi, 2016) una de las cuales será descartada (“cadena pasajera”), y la otra permanecerá unida a RISC (“cadena guía”).

Uno de los factores determinantes, en la selección de la cadena guía, son las estabilidades termodinámicas relativas de los dos extremos de la doble hélice. Por norma general, la hebra que alberga el apareamiento de bases termodinámicamente menos estable en su extremos 5' es la seleccionada (Tomari et al., 2004) y una vez que se una a las proteínas AGO, estas le confieren estabilidad (Matranga et al., 2005).

Una vez incorporada la cadena guía a RISC, el microRNA degradará el mRNA, en el caso de complementariedad total, o bien, reprimirá la producción de la traducción del mRNA, si la complementariedad es imperfecta (nº 6 en la figura 1; Hutvágner y Zamore, 2002; Zeng et al., 2002 y 2003; Doench et al., 2003).

2.3. Reconocimiento de los mRNA dianas

Una vez eliminada la cadena pasajera del complejo RISC, la cadena guía del miRNA localiza sus mRNA diana para dirigir su represión postranscripcional (Bartel, 2009).

Este reconocimiento se produce por complementariedad de bases, principalmente, a través de una zona altamente conservada en los microRNA metazoicos denominada “región semilla”, de 6 nt de longitud, comprendida, de forma general, entre los nucleótidos 2 y 7 en dirección 5'-3' (Lewis et al., 2003).

La función de la región semilla es la de reconocimiento y unión a regiones susceptibles, localizadas en los extremos 3'-UTR de los mRNA diana, dando como resultado la inhibición de la traducción (Lai, 2002, Shin, 2010). Existen diversos estudios “in vitro” que ponen en tela de juicio la capacidad, por sí sola, de producir todas las interacciones entre el microRNA y su diana (Brodersen y Voinnet, 2009), siendo necesarias otras características para promover la eficiencia de la unión microRNA/mRNA, como por ejemplo: el aumento, en el mRNA, de pares de bases AU cerca de los lugares de reconocimiento del microRNA, o bien la proximidad de los lugares de apareamiento del microRNA en el extremo 3' del mRNA (facilitando una acción cooperativa de varios microRNA; Grimson et al., 2007).

En algunos casos, puede producirse el reconocimiento de los mRNA diana mediante apareamientos de nucleótidos que pertenecen al extremo 3' del microRNA, denominados “regiones compensatorias 3' ” (descritas de forma más

detallada en el siguiente apartado; Lewis et al., 2005; Brennecke et al., 2005; Friedman et al., 2009) y también, en la región central (Shin et al., 2010).

Hay que tener en cuenta, que la disminución de la expresión de los mRNA diana no es específica de un solo microRNA, y que cada microRNA puede tener más de un mRNA diana.

2.4. Predicción de los mRNA diana mediante programas bioinformáticos

Un importante obstáculo en el estudio experimental de los microRNA, es precisamente, hallar experimentalmente sus mRNA diana. Para solventar este problema, se crearon herramientas bioinformáticas, las cuales, a priori, tuvieron resultados muy diversos.

Los programas bioinformáticos para la predicción de dianas, están basados en los apareamientos de bases que se produce entre el microRNA y el mRNA diana. Una de las regiones que más en cuenta tienen en sus algoritmos, es el apareamiento de la “región semilla” del extremo 5’UTR al mRNA diana y si esta unión es perfecta o hay presencia de desapareamientos, o bien, presencia de bucles (Rajewsky y Socci, 2004; Lewis et al., 2003). Otra de las propiedades que tienen en cuenta estos programas, tal como hemos explicado anteriormente, son las regiones 3’, aunque estas regiones no están tan conservadas evolutivamente, pudiendo sufrir ligeras variaciones en cuanto a longitud y cambios en las bases (Kerk et al., 2005), se pueden producir interacciones de reconocimiento de los mRNA, compensando de esta manera, errores en los apareamientos de la región diana; estos lugares reciben el nombre de “regiones compensatorias 3’ ”.

Además de estas interacciones, también puede ser usada la energía libre (energía libre de Gibbs) a la hora de medir la estabilidad de la unión del microRNA a su “teórico” mRNA diana (Yue et al., 2009) y la accesibilidad al lugar de unión, que es la medida de la facilidad con la que el microRNA puede localizar e hibridar con su mRNA diana (Mahen et al., 2010).

Algunas de las herramientas bioinformáticas más utilizadas y disponibles online, son: miRanda, miRanda MiRNase, miRWalk, TargetScan, DIANAmicroT, RNAHybrid, miRGen++, MiTarget, MiRtarget2, TarBase.

2.5. Mecanismos de regulación

El grado de complementariedad de bases se ha considerado clave en el proceso de regulación génica producida por los microRNA, ya que en muchos casos, los microRNA animales pueden unirse a los mRNA con errores o formando bucles. De esta manera, podemos explicar, que los microRNA regulan negativamente los genes de dos maneras a nivel postranscripcional: mediante la escisión del mRNA, cuando el grado de complementariedad de bases entre el microRNA y su diana es elevado, o mediante la represión de la traducción, cuando existen errores en la unión (Gu, 2010).

Una vez incorporada la hebra guía en un complejo RISC citoplásmico, se producirá una degradación total del mRNA en caso de que la complementariedad con el microRNA sea total, o reprimirá la traducción si el mRNA no tiene suficiente complementariedad para ser degradado (Hutvagner y Zamore, 2002; Zeng et al., 2002 y 2003; Doench et al., 2003).

Se ha descrito una acción de cooperación entre varios complejos RISC con el fin de aumentar la eficiencia en la inhibición de la traducción (Doench et al., 2003). Esto explica la presencia de múltiples sitios complementarios para los microRNA en la mayoría de dianas para los microRNA animales (Lee et al., 1993; Wightman et al. 1993; Abrahante et al., 2003).

Los mecanismos por los cuales miRISC regula la traducción han sido objeto de debate. Actualmente, se han propuesto tres modelos diferentes para explicar la forma en la que miRISC reprime la traducción, habiendo cierta controversia entre ellos sobre el momento en el que se produce, sí bien es al inicio o al final de esta.

Un modelo propone que existe una competencia entre miRISC y eIF4E para la unión a la estructura de caperuza del mRNA 5'. El segundo modelo propone que miRISC estimula la deasilación de la cola del mRNA y el tercero que miRISC bloquearía la asociación de la unidad 60S ribosomal con el complejo preiniciador 40S (Carthew et al., 2009; Filipowicz et al., 2008, Leung et al., 2006).

2.6. MicroRNA circulantes

En la década de los 70, Richard C. Kamm y Albert G. Smith en la Universidad de Tennessee, observaron la presencia de RNA intacto en plasma sanguíneo a pesar de la presencia en este medio de ribonucleasas (Kamm et al., 1972).

No fue hasta 2004 cuando el Dr El-Hefnaway y su equipo en la Universidad de Pittsburgh describieron por primera vez como el RNA se protegía de la degradación producida por las RNasas. Observaron que los microRNA salían al medio extracelular incluidos en exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos (Kosaka et al., 2010). Estudios adicionales han mostrado que los microRNA circulantes también se hallan unidos a proteínas de unión a RNA en vez de dentro de vesículas. Una importante porción de estos microRNA están asociados con AGO2, (proteína citoplasmática descrita con anterioridad en el apartado de biogénesis) dada su alta estabilidad (Arroyo et al., 2011), mientras que otros son liberados al medio extracelular unidos a la proteína nucleofosmina (NPM1) implicada en la exportación nuclear del ribosoma (Wang et al., 2010). Recientemente también se han observado microRNA asociados a partículas de HDL (High density lipoprotein, por sus siglas en inglés; Vickers et al., 2011).

Los microRNA circulantes muestran diferentes niveles de expresión en base a su dinámica funcional: el 66% se libera al medio extracelular al mismo nivel de su concentración intracelular, otro 13% parece estar selectivamente retenido en el interior de las células y por lo tanto no se encuentran en el medio extracelular, mientras que el 21% restante, parece ser liberado activamente, ya que se encuentra en elevadas concentraciones en el medio extracelular (Pigati et al., 2010).

La estabilidad mostrada por los microRNA en los fluidos, ha dado lugar a la teoría del posible papel que podían desempeñar “transmitiendo información” de una célula a otra, regulando así la expresión génica, bien, mediante la fusión de la vesículas con las células (Muralidharam-Chari et al., 2010; Skog et al., 2008) o por medios aún desconocidos como ocurre en el caso de los microRNA asociados a proteínas.

2.7. MicroRNA como biomarcadores

2.7A. Papel de los microRNA como biomarcadores

Un biomarcador puede ser algún elemento celular, genético o molecular medible que se asocie a la presencia de un estado patológico concreto y, por lo tanto ser usado para diagnosticar tales procesos, evaluar su pronóstico o indicar el estadio de la enfermedad, facilitando así el manejo de la misma. De acuerdo a este criterio los microRNA podrían ser biomarcadores óptimos.

Un biomarcador ideal debe presentar las siguientes características:

- Presentar alta especificidad y sensibilidad para detectar la presencia de un tipo de enfermedad. Como por ejemplo el ratio entre el miR-126 y miR-182 en muestras de orina para detectar cáncer de vejiga (Hanke et al., 2010).
- Debe ser útil para la detección de la enfermedad sin importar el género, edad o raza.
- Los niveles de síntesis, expresión y/o secreción deben correlacionar con la presencia de enfermedad. Como por ejemplo el aumento de niveles de miR-10b en metástasis de cáncer de pecho en suero (Zhao et al., 2012).
- Presentar estabilidad en la muestra biológica para que pueda ser medido con precisión después de que la muestra se haya extraído, manipulado o conservado. La estabilidad de los microRNA en los fluidos se genera a partir de sus asociaciones a vesículas, proteínas o HDL. Además, una vez extraídas las muestras, los microRNA son moderadamente estables durante 24 horas a temperatura ambiente y 72 h a -4°C (McDonald et al., 2011).
- Favorecer el desarrollo de un método de detección relativamente barato, simple y preciso que pueda reproducirse en cualquier laboratorio. Los microRNA pueden ser detectados por métodos cuantitativos utilizados rutinariamente en los laboratorios como la qPCR y micrarrays, este hecho hizo despertar un gran interés sobre el uso de estos como biomarcadores.
- Debe provenir de una fuente biológica accesible (sangre, orina, esputo...).

2.7B. Perspectivas futuras como biomarcadores

Hoy en día, la mayor parte de biomarcadores utilizados para el diagnóstico de enfermedades están basados en la detección de proteínas específicas, como por ejemplo: la detección de los niveles PSA (prostate specific antigen, de sus siglas en inglés) en el diagnóstico de cáncer de próstata (Carlsson, 2017).

Muchas veces el uso de este tipo de biomarcadores genera diversos obstáculos en su detección, como por ejemplo: modificaciones postranscripcionales proteicas o baja concentración en la muestra, además su detección está basada en el uso de anticuerpos, los cuales pueden dar lugar a reacciones cruzadas.

Los microRNA ofrecen algunas ventajas sobre los biomarcadores proteicos para su uso en medicina: son estables; están conservados entre las especies lo que genera facilidad para obtener reactivos útiles para su detección; pueden ser específicos de tejido; sus alteraciones están ligadas a estados patológicos concretos, y finalmente, pueden ser evaluados cuantitativa y cualitativamente por métodos utilizados de forma rutinaria en el laboratorio (Kappel, 2016).

3. MICRORNA EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS TEJIDOS ESQUELÉTICOS

Los microRNA participan en una amplia variedad de procesos biológicos, tanto de carácter fisiológico como patológico, mediante la regulación de genes a nivel postranscripcional.

En los últimos años se han producido numerosos avances en el estudio de los microRNA. El mayor reto ha sido identificar sus genes diana y determinar cómo, la regulación de estos genes, afecta al comportamiento celular.

Como ya explicamos anteriormente, los microRNA reprimen la expresión génica mediante la unión selectiva a la región 3'UTR del mRNA a través de complementariedad de bases.

El patrón de expresión de muchos de los microRNA, es específico de un tejido o tipo celular, pudiendo modular procesos de proliferación, diferenciación o

apoptosis celular. Mientras que la desregulación de su producción puede alterar la fisiología normal y conducir a diversas patologías degenerativas o proliferativas como el cáncer.

De esta manera no es de extrañar que, ya en los estadios más primigenios de nuestro desarrollo desempeñen un papel crucial en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y patrón celular responsable del desarrollo embrionario.

En este apartado relataremos como influyen los microRNA en diferentes procesos de la formación de los tejidos esqueléticos en las etapas del desarrollo de las extremidades del embrión.

3.1. MicroRNA implicados en la condrogénesis

3.1A. Condrogénesis

La condrogénesis es el proceso de formación, diferenciación y maduración del cartílago a partir del cual se forma el esqueleto y las articulaciones.

Durante la formación de los primordios esqueléticos, los condrocitos pueden tomar dos caminos:

1. Formar parte del cartílago articular.
2. Proliferar, diferenciarse a condrocitos hipertróficos entrando en apoptosis en el proceso denominado osificación endocondral por el cual se reemplaza el cartílago por hueso (diferenciación osteogénica) (Goldring, 2012). No obstante, el hecho de si los condrocitos hipertróficos diferenciados mueren por apoptosis o pueden sufrir también transdiferenciación a osteoblastos, no está totalmente resuelto (Yang et al., 2014).

Las fases del proceso de diferenciación condrogénica están reguladas molecularmente de forma compleja (figura 4 y 7). En líneas generales, el proceso está caracterizado por 4 pasos:

1. Migración y reclutamiento de las células mesenquimales.

2. Formación de los núcleos de condensación.
3. Diferenciación a condrocitos.
4. Maduración de los condrocitos.

Este proceso se encuentra regulado por las interacciones que se producen célula a célula y de la célula con la matriz extracelular.

La condrogénesis (como hemos mencionado) se inicia por la agregación de células madre mesenquimales, capaces de proliferar, y diferenciarse. Estas células se agrupan formando condensaciones en las que no hay proliferación (Janners et al., 1970; summerbell y Wolpert, 1972). Cuando los núcleos de agregación alcanzan un nivel crítico empiezan a proliferar y a diferenciarse (Ahrens et al., 1977; Richman y Mitchell, 1996) dando lugar a condensaciones pre-cartilaginosas formadas por condroblastos, que inician la síntesis y regulación de la matriz extracelular (Swingler et al., 1998).

Los núcleos de condensación mesenquimales expresan varias moléculas de la matriz extracelular como Col2a (IIa) (isoforma IIa del colágeno tipo 2) y moléculas de adhesión como fibronectina, tenascina, Ncad (N-cadherin), Ncam1 (N-cam) de extrema importancia para el mantenimiento de la condensación celular (Oberlender y Tuan, 1994).

Las células condensadas expresan también un importante factor de transcripción denominado Sox9 (SRY-box9). La expresión de este factor se ve reducida en los condrocitos hipertróficos, como se representa en la figura 4 (Ikeda et al 2005; Akiyama et al., 2002; Bi et al., 2001; Zuscik et al., 2008).

La transcripción de Sox9 está regulada por FGF, TGF β (transforming growth factor- β , por sus siglas en inglés), BMP (bone morphogenetic protein, por sus siglas en inglés) y por la vía de señalización de Wnt (DeLise et al., 2000; Goldring et al., 2006; Sahar et al., 2005). Sox5 y Sox6 se expresan junto Sox9 durante la diferenciación condrogénica y cooperan para dar lugar a la activación de *Col2a1* y *aggrecan*, dos genes específicos de cartílago, que codifican proteínas mayoritarias de la matriz extracelular del cartílago (Ikeda et al., 2004).

Además de la regulación de Sox9, TGF β inicia la expresión de las proteínas de la matriz del cartílago oligomérico (COMP), proteoglicanos (Aggrecan), colágeno (tipo II y XI) y moléculas de adhesión (N-cadherin, N-cam, fibronectin, tenascin; Derfoul et al., 2006) que inician la condensación de estas células condroprogenitoras y su transición a condrocitos maduros (DeLise et al., 2000). Además, favorecen el establecimiento de puntos de anclaje que permiten las reorganizaciones celulares durante el proceso de agregación precondrogénica (Montero and Hurle, 2007).

Por otra parte, se ha observado una gran influencia de otros miembros de la superfamilia de TGF β , los BMPs (Barna et al., 2007), ya que además de estar implicados en la regulación de la expresión de Sox9, BMP2 y BMP4 se caracterizan por ser potentes factores de crecimiento implicados conjuntamente con los TGF β en inducir la formación de cartílago mediante la diferenciación de los condrocitos (resumido en los apartados de condensación, proliferación y diferenciación de la figura 7; Soullier et al., 1999).

Los condrocitos mitóticamente activos, son los encargados del crecimiento longitudinal de los huesos, e inicialmente, podemos encontrarlos en los centros primarios de osificación, que se sitúan en el centro de la diáfisis (parte central de los huesos largos) del cartílago. Posteriormente, también podemos encontrarlos en los centros secundarios de osificación y en la placa de crecimiento.

Las placas epifisarias se localizan en los extremos de las diáfisis de los huesos largos y son las responsables del crecimiento en longitud de los huesos. Constituyen un modelo excelente de osificación endocondral (Cancedda et al., 1995), que se caracteriza por perfiles específicos en cuanto a expresión génica, actividad celular y perfil histológico como podemos apreciar en las figuras 4, 5, 6 y 7.

En los centros de osificación primarios, al igual que en la placa epifisaria, las células proliferativas de las zonas cartilaginosas de crecimiento tienen forma redondeada y expresan marcadores tempranos como Sox9, Col2a1, Agc1, y en menor medida Fgfr3 (FGF receptor3; Deng et al., 1996; Zhao et al., 1997) el cual es un regulador negativo de la ruta de Ihh (indian hedgehog; Vortkamp et al., 1996; St-Jacques et al., 1999; Long et al., 2001; Hilton et al., 2007).

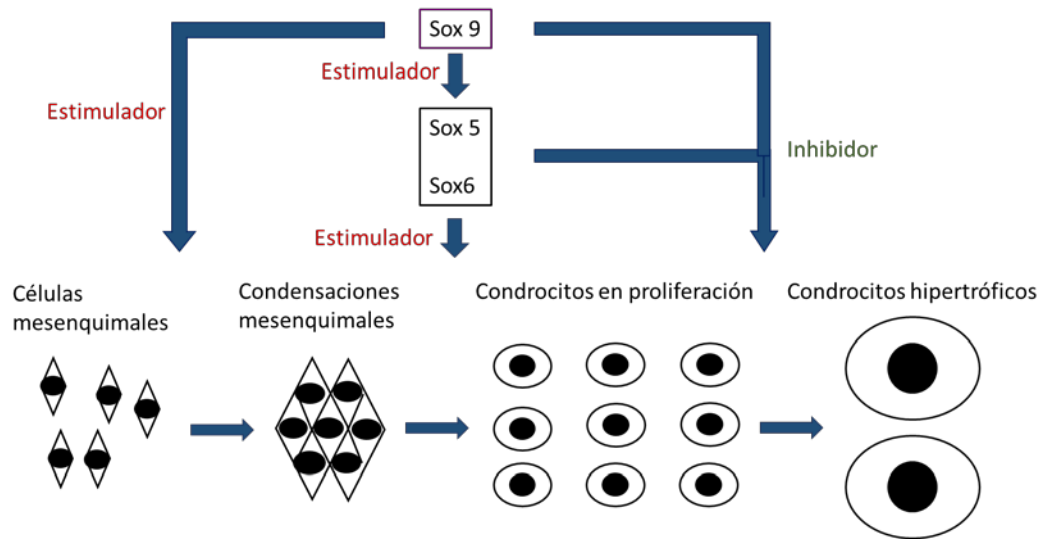


Figura 4: esquema del papel que desempeñan los genes Sox 5, Sox 6 y Sox 9 en las diferentes etapas de la diferenciación condrogénica (modificado de Ikeda et al., 2005).

El factor de transcripción Sox9 es necesario para la diferenciación condrogénica tanto antes como después de la formación de las condensaciones celulares mesenquimales, no obstante, se ha observado que para que se produzca con éxito la diferenciación de las condensaciones celulares mesenquimales Sox5, Sox6 y Sox9 deben expresarse conjuntamente (Ikeda et al., 2004; Ikeda et al., 2005). Por último, observar que su expresión inhibe el paso de la transición de los condrocitos en transición a hipertróficos.

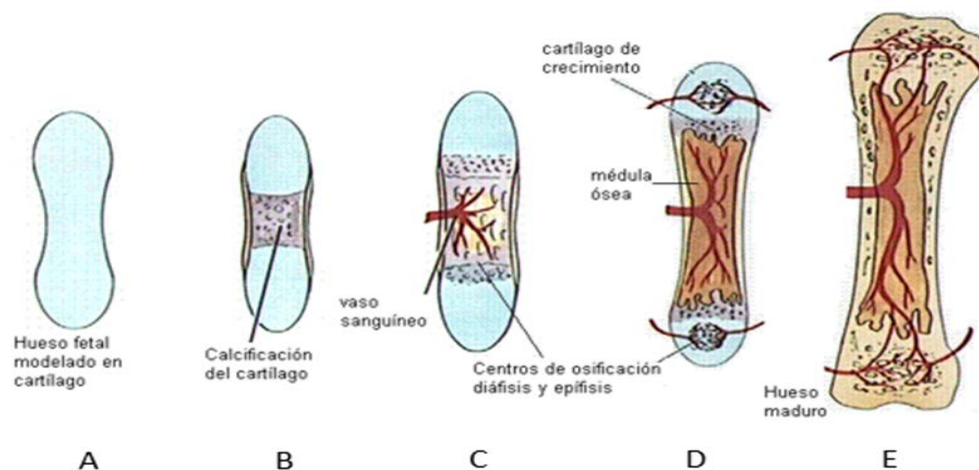


Figura 5: esquema general de la osificación endocondral.

(<https://aprendehuesosymusculos.wordpress.com/formacion-y-crecimiento-de-los-huesos/>)

A) En la primera etapa, en los esbozos cartilaginosos del hueso los condrocitos ya diferenciados, proliferan dando lugar a un modelo cartilaginoso que adopta una forma similar al hueso al que va a dar origen. Este “molde cartilaginoso” se encuentra recubierto por una capa de tejido conjuntivo que le aporta sustancias nutritivas denominado pericondrio.

B) En el proceso de osificación endocondral, una vez osificadas las diáfisis y parte de las epífisis de los huesos largos, a nivel de las metáfisis se forma la denominada placa de crecimiento formada por condrocitos en continua proliferación, que subsecuentemente sufre diferenciación hipertrófica hasta degenerar, siendo luego sustituida por tejido óseo que avanza desde las diáfisis. C) De forma paralela, se produce la vascularización desde el periostio del cartilago mineralizado; además de la invasión de la zona por los osteoblastos que sustituirán a las células degeneradas. D) Los centros epifisiarios aparecen después del nacimiento, por lo que el proceso de osificación endocondral se produce de forma progresiva desde la etapa embrionaria prolongándose después de la pubertad hasta formar el hueso maduro (E).

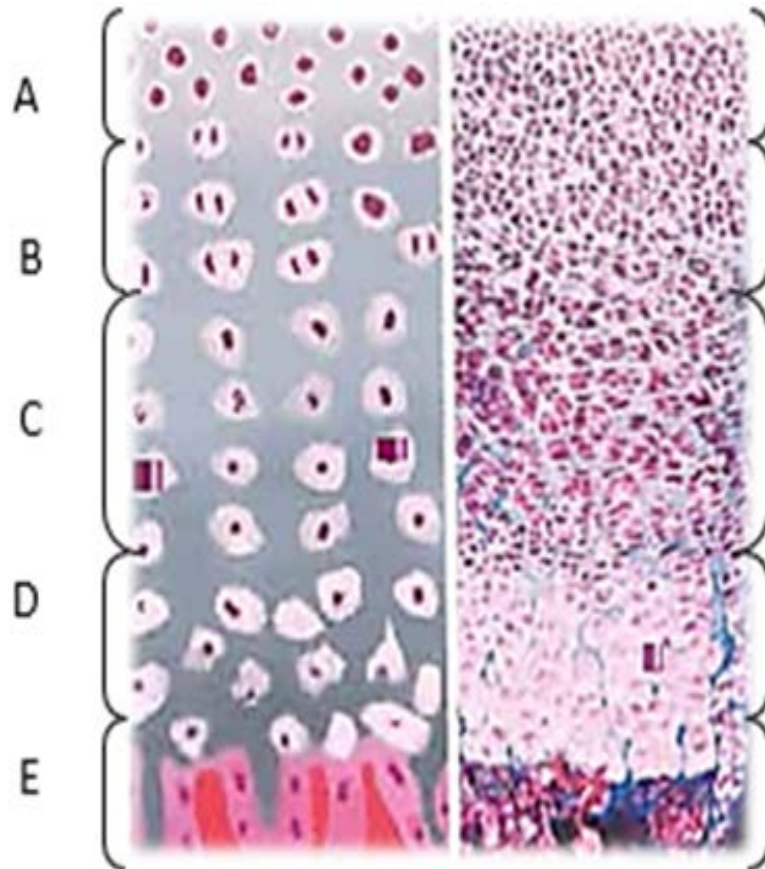


Figura 6: sección histológica (derecha) y representación esquemática (izquierda) de la placa epifisiaria (Modificado de García-Porrero y Hurlé, Anatomía Humana, 2005).

La placa epifisaria, la zona más próxima a la epífisis, está constituida por células cartilaginosas de forma oval. En esta zona existe una intensa síntesis de matriz extracelular, y recibe el nombre de zona de reposo o de reserva (A). A continuación hay una zona que presenta condrocitos con intensa actividad proliferativa alineados en dirección al eje longitudinal del hueso denominada zona proliferativa (B); seguida de una zona de cartílago hipertrofiado (C), donde condrocitos de gran tamaño sufren una progresiva degeneración para formar una zona de cartílago calcificado (D). En este momento se produce un cambio de celularidad y los osteoblastos sustituyen al cartílago degenerado por tejido óseo (E), mientras que de forma paralela, se produce el proceso de vascularización del tejido.

Cuando los condrocitos proliferan, se agrupan formando columnas paralelas al eje de crecimiento produciendo grandes cantidades de componentes de la matriz extracelular.

Los condrocitos prehipertróficos se agrandan ligeramente e inician la expresión de Indian hedgehog (Ihh), un miembro de la familia de moléculas de señalización hedgehog (Echelard et al., 1993), y de la proteína relacionada con la hormona paratoidea (PTHrP) (resumido en el apartado de diferenciación y maduración en la figura 7; Suva et al., 1987). Estos factores de señalización tienen un papel reseñable sobre el control de la tasa de maduración de los condrocitos, ya que retrasan su hipertrofia (Karaplis et al., 1994; Amizuka et al., 1996; St-Jacques et al., 1999).

Una vez los condrocitos dejan de proliferar y se hipertrofian, incrementan la expresión de factores de transcripción como *Runx* y *Osterix*, que participan en la diferenciación de los osteoblastos. También se produce un aumento de la producción de fosfatasa alcalina (AP) requerida en la mineralización del cartílago, (Inada et al., 1999; Yoshida et al., 2004; Nakashima et al., 2002) que calcifica la zona circundante, evitando la difusión de sustancias, produciendo la muerte de los condrocitos y la degradación de la matriz residual. De forma paralela a este proceso de mineralización, los condrocitos ya hipertróficos pasan de generar Col IIA a Col X, además de elevados niveles de VEGF (vascular endothelial growth factor, por sus siglas en inglés), de gran importancia a la hora de la formación de la vascularización que soporta la osificación (Gerber et al., 1999).

Las metaloproteinasas (MMP) 9, 13, 14 son enzimas que controlan la degradación de la matriz del cartílago, expresadas por los condrocitos hipertróficos, precediendo a la calcificación (resumido en el apartado de “diferenciación final en la figura 7; Mattot et al., 1995; Onyekwelu et al., 2009).

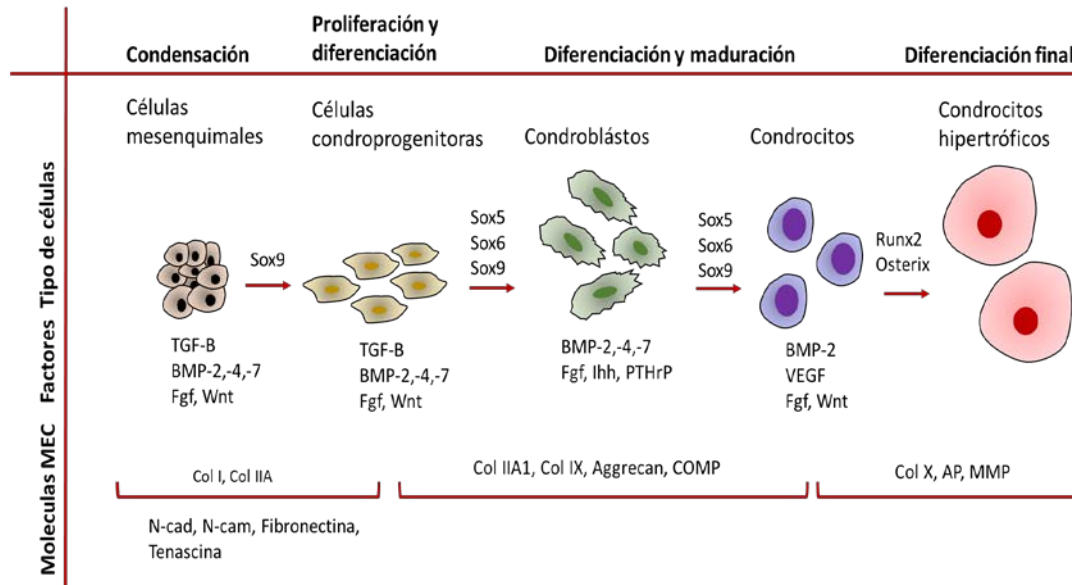


Figura 7: esquema general de la regulación génica durante la condrogénesis (adaptado de Vanatier et al., 2009).

3.1B. Papel de los microRNA en la condrogénesis

Los microRNA juegan un papel crucial en la regulación de múltiples procesos celulares y por lo tanto son de gran importancia a la hora de la formación y remodelación del cartílago, regulación de la homeostasis y diferenciación condrogénica.

En las siguientes tablas (tabla 1a y tabla 1b) mostramos los diferentes microRNA, según lo descrito en la literatura, implicados en la regulación de la condrogénesis.

MicroRNA	Genes diana	Función	Referencia
miR-1	ND	Regulación de la hipertrofia de los condrocitos	Sumiyoshi et al., 2010
miR-18a	CCN2/CTGF	Regulación de la osificación endocondral	Ohgawara et al., 2009
miR - 21	ND	Regulación de la proliferación condrocítica y síntesis de la matriz extracelular	Kongcharoensombat et al., 2010
miR-23b	PKA	Regulador de la diferenciación condrogénica	Ham et al., 2012
miR-29a/b	Col2a1	Regulador de la diferenciación condrogénica	Yan et al., 2011
miR -30a	DLL4	Regulación diferenciación condrogénica de las células mesenquimales	Tian et al., 2016
miR-92a	Noggin3	Regulación de la diferenciación y proliferación de los condrocitos	Ning et al., 2013
mir-99a	BMPR2	Regulación de la diferenciación temprana de los condrocitos	Zhou et al., 2016
mir-101	Sox9	Regulación de la diferenciación de los condrocitos	Dai et al., 2012
mir-140	HDAC4	Regulación de la hipertrofia de los condrocitos	Tuddenham et al., 2006
	CXCL12	Regulación de la hipertrofia de los condrocitos	Nicolas et al., 2008
	SP1	Regulación de la proliferación de los condrocitos	Yang et al., 2011
	DNEP	Regulación de la osificación endocondral	Nakamura et al., 2011
	BMP2	Regulación de la osificación endocondral	Nicolas et al., 2011
miR-34a	RhoA/Rac1	Reorganización de la actina del citoesqueleto	Kim et al., 2012
	EphA5	Inhibición de la migración de los condroblastos	Kim et al., 2011a
miR-142-3p	Adam9	Regulación de la condrogénesis en la extremidad	Kim et al., 2011b

ND: no definido.

Tabla 1a: microRNA, implicados en la regulación de la condrogénesis.

MicroRNA	Genes diana	Función	Referencia
miR-145	Sox9	Regulador negativo de la diferenciación condrogénica	Yang et al., 2011
miR-181	COL10A1	Regulación de la diferenciación condrocítica	Gabler et al., 2015
miR-193b	TGFβ2	Regulación de la condrogénesis temprana	Hou et al., 2015
miR-194	Sox5	Regulación de la diferenciación y proliferación de los condrocitos	Xu et al., 2012
miR -199	smad1	Regulador negativo de la diferenciación condrogénica	Lin et al., 2009
miR-222	Runx2	Regulación de la diferenciación osteogénica	Yoshizuka et al., 2016
	COL1A1		
	Osteocalcin		
	COL2A1		
	AGC		
	Sox9		
miR-337	TGFβ R2	Regulación de la osificación endocondral	Zhong et al., 2012
miR-365	HDAC4	Regulación de la hipertrofia de los condrocitos y diferenciación de los osteoblastos	Guan et al., 2011
miR-455-3p	Runx2	Regulación de la diferenciación condrocítica	Zhang et al., 2015
miR-488	ND	Regulación de la condensación de las células mesenquimales	Song et al., 2013
miR-490-5p	BMPR2	Regulación de la diferenciación condrocítica	Zhang et al., 2012
miR-375	Cadherin-7	Inhibición de la condensación pre-cartilaginosa	Song et al., 2012
miR-221	Mdm-2	Promueve la proliferación de los progenitores	Kim et al., 2010

ND: no definido.

Tabla 1b: microRNA implicados en la regulación de la condrogénesis

3.2. MicroRNA implicados en la tenogénesis

3.2A. Tendones

Los tendones y ligamentos están formados por tejido conectivo especializado en transmitir y resistir las fuerzas originadas entre los músculos y los huesos. Los tendones fijan el músculo al esqueleto, mientras que los ligamentos estabilizan las articulaciones. Ambos están formados principalmente por fibroblastos rodeados de matriz extracelular compuesta por fibrillas de colágeno las cuales le confieren gran resistencia a las fuerzas de tensión generadas en los movimientos.

3.2A.1. Estructura del tendón

La composición del tejido conectivo tendinoso no es homogénea (ver figura 8).

En la zona próxima al músculo conocida como unión miotendinosa, la interfaz entre el tendón y el músculo (A figura 8) consiste en interdigitaciones de membranas plasmáticas de células musculares y tendinosas denominadas procesos dactilares (Tidball et al., 1989). A nivel molecular, las fibrillas de colágeno producidas por el tendón se unen a las lamininas o integrinas presentes a nivel del sarcolema de las células musculares (Bökel et al., 2002).

La zona central denominada cuerpo del tendón (B figura 8) está compuesta por fibrillas de colágeno tipo I formadas por una triple hélice compuesta por dos cadenas moleculares de $\text{Col1}\alpha 1$ y otra cadena de $\text{Col1}\alpha 2$. Estas fibrillas se unen sucesivamente formando las fibras de colágeno que a su vez se agrupan en fascículos tendinosos (Screen et al., 2015). Dentro de los fascículos se pueden distinguir varios niveles o categorías: los fascículos tendinosos, primarios y secundarios, se encuentran envueltos por un tejido conectivo denominado endotenón. Este tejido conectivo contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y nervios (Benjamin et al., 2002). Estos se agrupan en fascículos terciarios, que a su vez son

empaquetados por el epítendon formando los fascículos tendinosos cuaternarios (Benjamin et al., 2002; Screen et al., 2015).

La zona de unión al hueso o zona osteotendinosa (C figura 8) está formada (en dirección del tendón al hueso) por tenocitos; células fibrocartilaginosas no calcificadas; células fibrocartilaginosas calcificadas; y finalmente por osteocitos. (Benjamin et al., 2002).

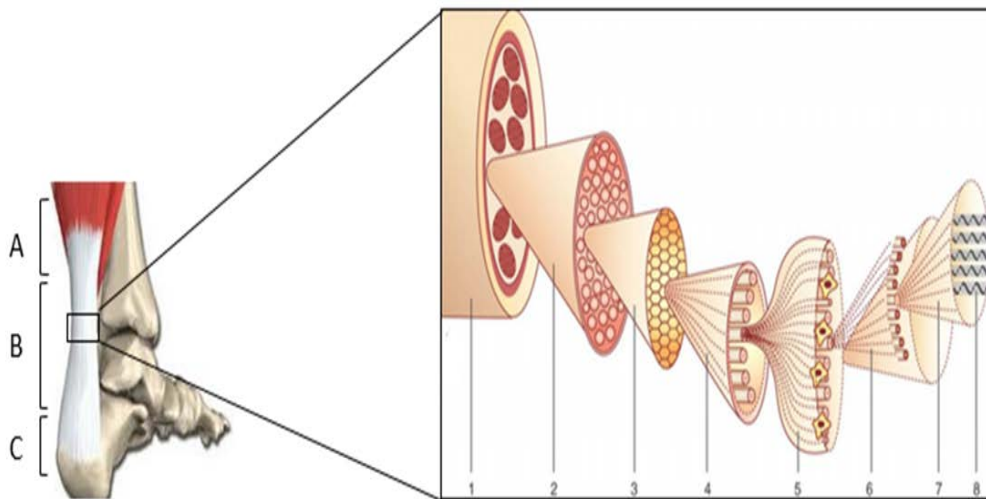


Figura 8: estructura del tendón.

(modificado de <https://protesisdecaderaiaq.wordpress.com/>: Autor: Espinoza et al., 2016; <http://definicion.de/tendon/>).

A) Unión miotendinosa. B) Cuerpo del tendón: 1) fascículo fibroso cuaternario cubierto por el epítendon y a su vez envuelto por el paratenón; 2) fascículo fibroso terciario; 3) fascículo fibroso secundario cubierto por el endotendón; 4) fascículo fibroso primario formado por varias fibras de colágeno; 5) fibra de colágeno; 6) fibrilla de colágeno; 7) microfibrilla de colágeno; 8) triple fibra de colágeno. C) Unión osteotendinosa o entesis.

3.2B. Tenogénesis

3.2B.1. Orígenes embrionarios

Los tendones comparten el mismo origen embrionario que otros tejidos esqueléticos (cartílago y hueso).

En los vertebrados, los tendones craniofaciales se originan a partir de la cresta neural (Grenier et al., 2009), mientras que los axiales derivan de un compartimento somítico denominado Sindetomo (Brent et al., 2003), una subregión del esclerotomo el cual da lugar al esqueleto axial. Los músculos axiales están originados a partir del dermomiótomo (Brent et al., 2003), mientras que los tendones y huesos de las extremidades provienen de la placa mesodérmica lateral (Kieny et al., 1979).

3.2C. Marcadores moleculares expresados durante el desarrollo del tendón

3.2C.1. Marcadores transcripcionales

Contrariamente a otros tejidos musculoesqueléticos, poco se conoce del papel intrínseco de los marcadores moleculares en el desarrollo del tendón, siendo necesario profundizar más en su investigación.

3.2C.2. Escleraxis (scx)

Escleraxis es un factor de transcripción expresado en todas las células progenitoras de tendones y ligamentos que facilita la detección de los principales eventos producidos en el desarrollo del tendón (Schweitzer et al., 2001). Por otro lado, también favorece la expresión de otros marcadores de diferenciación como *Col1a1* y *tenomodulin* (Lejard et al., 2007; Carlberg et al., 2000; Shukunami et al., 2006).

3.2C.3. Mohawk (Mkx)

Este gen es un represor transcripcional que codifica una proteína que contiene un homodominio atípico que reprime la actividad transcripcional. En el tendón, su función durante el desarrollo todavía no es del todo conocida no obstante, estudios recientes han demostrado su efecto en la diferenciación de los tenocitos; además de desempeñar un papel fundamental en la maduración y crecimiento del tendón (Liu et al., 2010).

3.2C.4. Respuesta temprana al crecimiento (Early Growth Response; Egr)

Es un factor de transcripción también conocido como Krox-24, TIS8, y ZENK; cuyos genes diana influyen en la diferenciación y proliferación. En vertebrados encontramos 4 miembros de esta familia de factores transcripción (*Erg1*, *Erg2*, *Erg3*, *Erg4*), de los cuales solo *Erg1* (expresado en las uniones miotendinosas y en el epiteton) y *Erg2* (expresado en todo el tendón en general) se expresan en tendón durante el desarrollo embrionario (Lejard et al., 2011).

3.2C.5. Sine Oculis-Related Homeobox (Six)

Se ha descrito su potencial función en el desarrollo del tendón (Bonnin et al., 2005). *Six1* se expresa en los tendones extensores y *Six2* en los tendones flexores de los dedos (Oliver et al., 1995; Dreyer et al., 2004). Estudios iniciales sugirieron que *Six1* podría estar involucrado en los estadios iniciales del desarrollo del tendón, hecho que fue refutado posteriormente cuando se comprobó que estos eran independientes de *Six1* y este aparecía posteriormente (Bonnin et al., 2005).

3.2D. Otros marcadores

3.2D.1. Tenomodulin (Tnmd)

Tenomodulin es un marcador tardío de la morfogénesis del tendón, cuya expresión regula positivamente la expresión de Scx en los tenocitos. Tnmd es un gen altamente específico de ligamento y tendón, ya que no existe expresión de éste en otros tejidos del sistema musculoesquelético (Shukunami et al., 2001).

3.2D.2. Thrombospondin 4 (Thbs4)

En vertebrados la familia THBS está formada por cinco miembros, siendo Thbs4 altamente específico de tendón. No se ha visto que desempeñen ningún papel estructural en la ECM, como lo hacen los colágenos o las elastinas, aunque no obstante son conocidas por regular muchas de las interacciones proteína-proteína y proteína-célula en las uniones miotendinosas (Adams, 2001; Bornstein, 2001). Aunque no desempeña ningún papel en la diferenciación del tendón, suele usarse como marcador de tendón menos específico que Tnmd (Subramanian et al., 2014; Frolova et al., 2014).

3.2E. Reguladores de las señales de inducción y diferenciación en el tendón

3.2E.1. Factores de crecimiento fibroblástico (FGF)

A nivel celular, la expresión de FGF regula positiva o negativamente procesos celulares básicos como: proliferación, supervivencia, migración, diferenciación y metabolismo.

En tendón la ruta de FGF es la primera señal conocida en inducir la diferenciación celular in vivo. A su vez, esta señal también es la encargada de inducir la expresión de Scx (Edom-Vovard et al., 2002).

3.2E.2. Superfamilia de factores de crecimiento transformante β (TGF β)

La superfamilia TGF β , está compuesta por unos 30 miembros incluyendo TGF β , las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), las activinas y nodal, entre otros.

En el tendón, se ha descrito la capacidad del grupo formado por TGF β /activin y nodal para inducir la expresión de Scx y otros marcadores de tendón; mientras que el grupo formado por BMP/GDF los reprime (Huang et al., 2015).

3.2F. MicroRNA descritos durante la formación del tendón

Los microRNA, en este campo, también han despertado interés por ser considerados reguladores epigenéticos que median en múltiples actividades biológicas, incluyendo la diferenciación de las células madre.

Aunque son muchos más los estudios que se han centrado en el estudio de los microRNA en tenopatías, Dos estudios recientes relatan la influencia de los microRNA durante su diferenciación:

- En 2014 el Dr. Andriy S. Yatsenko del grupo de investigación de expresión génica y señalización del Instituto Max Planck en Alemania, en un estudio sobre la formación de las uniones miotendinosas con *Drosophila melanogaster*, identificaron que el miR-9a regulaba el distroglicano, que es el componente fundamental del complejo de glicoproteínas de unión a distrofina, sirviendo de puente entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular en células musculares y en neuronas; canalizando, por lo tanto, la formación de la unión entre el músculo y el tendón (Yatsenko et al., 2014)
- En 2016 el Dr. Wang y su equipo en la Universidad de Hong Kong, observó que el microRNA miR-124-3p inhibía la expresión del factor de transcripción *Egr1*. Este factor de transcripción promueve la diferenciación del tendón a través de la activación de la expresión de marcadores del tendón como *scx*, *mxk*, *col1a1* (Guerquin et al., 2013; Woodman, 2013; Tao et al., 2015). Por lo tanto, demostró en su trabajo que miR-124-3p suprimía la formación de colágeno en las células madre humanas de las cuales derivan los tendones. De esta manera,

miR-124 puede ser una diana terapéutica potencial para la lesión en el tendón (Wang et al., 2016).

3.3. MicroRNA implicados en senescencia y apoptosis durante el desarrollo embrionario

Durante el proceso del desarrollo del embrión, es necesario que a la vez que va tomando forma el organismo, se elimine el exceso de células de las estructuras como compensación a la sobreproducción celular que tiene lugar en un primer momento. Esta delección celular que se produce durante la organogénesis lleva implícita “muerte celular programada” que tiene lugar, en la inmensa mayoría de los casos, por “apoptosis”.

La apoptosis se caracteriza por ser un proceso activo que consume energía y que no desencadena una respuesta inflamatoria (Kerr et al., 1972), además de ser esencial en el normal desarrollo y en la homeostasis de los tejidos (Adams y Cory, 2007; Meier y Vousden, 2007). Una vez se desencadena, a nivel celular, podemos observar cambios morfológicos y bioquímicos específicos, como la pérdida de adhesión con células vecinas además de la formación de vacuolas, la fragmentación y condensación nuclear y citosólica con la consecuente aparición de cuerpos apoptóticos, y la exposición, en la superficie celular, de la fosfatidilserina.

Un ejemplo fehaciente de las funciones morfogenéticas derivadas de la apoptosis a la hora de esculpir los órganos, lo observamos en el espacio interdigital de las extremidades del embrión de los animales vertebrados, que analizamos en el presente estudio.

Las extremidades del embrión son estructuras simples, de forma redondeada, situadas en la superficie lateral del cuerpo del embrión, que a su vez, están formadas por un agregado de células mesodérmicas cubiertas por una capa de ectodermo. Este conjunto de células que conforman la extremidad primitiva, son las que al diferenciarse, darán lugar a las distintas estructuras presentes en la extremidad adulta; mientras que las células indiferenciadas que han finalizado su función formarán regiones apoptóticas, siendo más o menos evidentes, según la adaptación evolutiva al medio de cada animal, como por ejemplo: la regresión total, que se

produce en el tejido presente en el espacio interdigital, en el caso de los dedos libres de los simios, necesarios para el uso de herramientas versus la permanencia del tejido del espacio interdigital en animales adaptados a la natación como el pato, o al vuelo, como el murciélago, donde podemos observar membranas interdigitales (Ganan et al., 1998; Weatherbee et al., 2006).

A nivel molecular, su activación está estrechamente regulada y en los vertebrados existen dos vías principales de inducción de la apoptosis. Una de ellas es la “ruta apoptótica mitocondrial o vía intrínseca”, la otra, que inicia la apoptosis a partir de los receptores de muerte, se denomina vía extrínseca. Ambas vías confluyen finalmente en la activación de las caspasas (Montero y Hurlé, 2010). Hay que tener en cuenta que perturbaciones en su regulación conducen a diferentes patologías, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes y degenerativas (Adams y Cory, 2007; Meier y Vousden, 2007).

3.3A. Vía intrínseca, vía de estrés o mitocondrial

La vía intrínseca esta evolutivamente muy conservada entre especies, y como su propio nombre indica, se inicia dentro de la célula desencadenando su muerte a modo de autodegeneración. Independientemente del estímulo que precede al desencadenamiento (daño del DNA, estrés térmico u oxidativo, etc.) esta vía es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y de la liberación de moléculas proapoptóticas tales como la citocromo-C hacia el citoplasma. Esta vía está regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia *Bcl-2*, el nombre de la familia se debe al primer miembro, que fue aislado como un gen implicado en el linfoma de células B y es homólogo del represor de la apoptosis *ced-9* de *C. elegans* (Tan et al., 2011). Esta familia de genes puede clasificarse en tres grupos según sus similitudes estructurales, basadas en sus dominios de homología BH1-4, y funcionales, dependiendo si son proapoptóticas o antiapoptóticas (ver figura 9).

- **Proteínas antiapoptóticas:** Bcl2, Bclxl, Mcl1, BCL-W, A1/BFL1 presentan los cuatro dominios de homología, aunque la capacidad antiapoptótica se

relaciona con el dominio BH4, su dominio hidrofóbico C-terminal facilita su inserción en la membrana externa mitocondrial (Cory et al., 2003).

- **Proteínas proapoptóticas BAK y BAX:** presentan los dominios de homología BH1, 2 y 3, pero no el BH4. Su activación da lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial con la subsecuente salida del citocromo C al exterior
- **Proteínas proapoptóticas BH3:** Bad, Bid, Bim, PUMA, Bik, Noxa, BMF. El inicio de la apoptosis está íntimamente asociado con la activación, mediada por p53, de las proteínas proapoptóticas BH3. Estas proteínas, se unen a las proteínas antiapoptóticas, de las cuales depende directamente la integridad del dominio de unión BH3 y su lugar de anclaje (la estructura de estas proteínas se encuentra resumida en la figura 9 Hinds et al., 2007; Delbridge y Strasser, 2015).

Una vez se ha producido la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, un conjunto de proteínas que normalmente se encuentra en el espacio entre la membrana externa e interna se libera, incluyendo el citocromo C, que induce la formación del apoptosoma (smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF, del inglés apoptosis-inducing factor y endonucleasa G; Saelens et al., 2004). Una vez en el citosol, estas proteínas inician la ejecución de la muerte celular promoviendo la activación de las caspasas o actuando como efectores de muerte por una vía independiente de caspasas (resumida en la figura 10; Saelens et al., 2004).

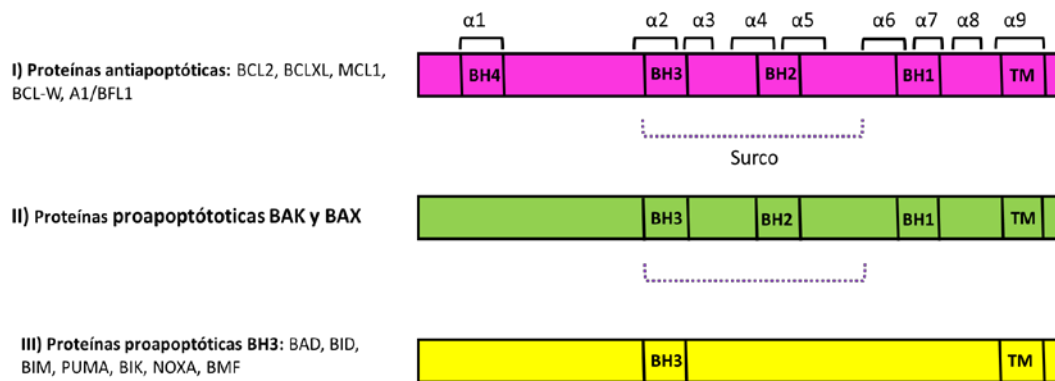


Figura 9: esquema básico de la secuencia y homología estructural de la familia de proteínas Bcl2 (modificado de: Dewson y Kluck, 2009).

Las proteínas de la familia Bcl2 se encuentran clasificadas en tres grupos según su función: I) *Proteínas antiapoptóticas*, poseen los cuatro dominios BH. II) *Proteínas proapoptóticas BAK y BAX*, encargadas de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, no poseen el dominio BH4 III) *Proteínas proapoptóticas BH3*, encargadas de iniciar la vía intrínseca de la apoptosis, sólo poseen el dominio BH3. Algunos miembros, también poseen un dominio hidrofóbico C-terminal transmembrana (TM), que puede anclar proteínas de la membrana externa mitocondrial. Bak, Bax y las proteínas proapoptóticas, adoptan una estructura α -helicoidal similar. Las interacciones entre los diferentes miembros de la familia de Bcl2 se producen mediante la unión del dominio BH3 al surco hidrofóbico (región comprendida entre las hélices α 2-5) de la superficie proteica.

3.3B. Vía extrínseca

En esta vía la apoptosis se induce a partir de la unión de una proteína extracelular, conocida como mensajero mortal, a su receptor, el receptor de muerte.

Los receptores de muerte son miembros de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF). Esta superfamilia está formada por un grupo de más de 20 proteínas cuyas funciones abarcan un cuantioso número de funciones biológicas, incluyendo: la regulación de la muerte celular, supervivencia, diferenciación celular o regulación de la inmunidad (Walczak y Krammer, 2000; Ashkenazi, 2002). Estos receptores de muerte se caracterizan por poseer un dominio citoplasmático compuesto por 80 aa conocido como “dominio de muerte” (DD, death domain, por sus siglas en inglés) encargado de transmitir las señales de muerte desde el exterior de la célula al interior.

Los receptores de muerte más conocidos son: CD95 (APO-1/Fas) claves en la regulación inmunitaria, TNFR1, TRAIL-1 y TRAIL-2, DR3 (TRAMP/Apo-3/WSL-1/LARD) o DR6 (Walczak y Krammer, 2000). Los ligandos de esta superfamilia comprenden los ligandos de los receptores de muerte, como por ejemplo, el ligando CD95 (CD95L), TNFa, LYMPHOTOXINa, los cuales se unen a TNFR1, y TRAIL / TWEAK ligandos de DR3 (Walczak y Krammer, 2000).

La ruta mejor conocida es la iniciada mediante la unión del ligando de Fas (FasL, CD95L o APO-1L), que pertenece a la familia de las citoquinas TNF (Nagata, 1997) e induce apoptosis tras su unión con el receptor Fas de la superficie celular, tras su ligación y oligomerización, se une a una proteína adaptadora FADD (Fas-Associated protein with Death Domain, por sus siglas en inglés) a través de su dominio de muerte. Esta proteína contiene dos dominios, el dominio C terminal, dominio de muerte (DD), y un dominio N terminal conocido como el dominio efector de muerte (DED, death effector domain, por sus siglas en inglés). DED se unirá a la caspasa 8 (incluida en el grupo de las caspasas iniciadoras junto con la caspasa 9) que activará la caspasa 3 (caspasa efectora), que llevará a cabo la apoptosis mediante la escisión de diversas proteínas celulares (resumida en la figura 10; Waring y Müllbacher, 1999; Nagata, 1997).

Algunos estudios han demostrado que el proceso de regresión celular, que se produce en el interdígito durante el proceso de desarrollo del embrión, es mucho más complejo que lo que se pensó en un principio (Ahuja et al., 1997; Garcia-Martinez et al., 1993; Salas-Vidal et al., 1998 y 2001; Hernandez-Martinez et al., 2011; McCulloch et al., 2009; Zuzarte-Luis et al., 2006 y 2007; Montero et al., 2010; Suda et al., 2014; Eshkar-Oren et al., 2015; Diaz-Mendoza et al., 2013). Se ha descrito la presencia de los componentes de la vía extrínseca de muerte en el interdígito (Svandova et al., 2016).

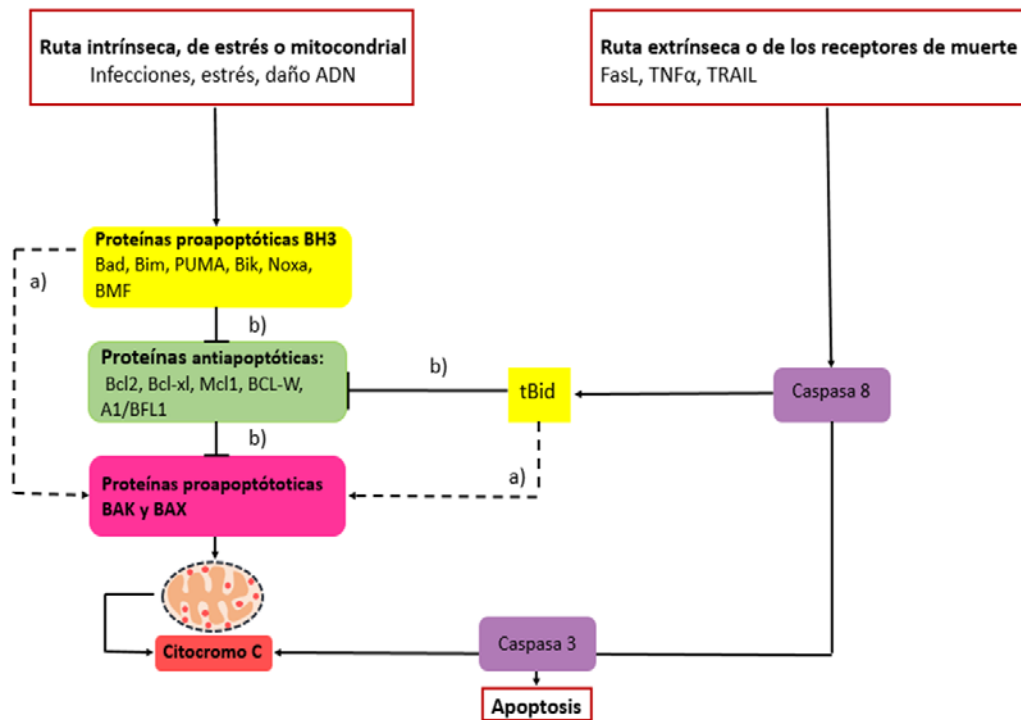


Figura 10: esquema básico de las rutas apoptóticas (modificado de: Westphal et al., 2011).

La ruta mitocondrial, de estrés o intrínseca, se desencadena como respuesta al estrés celular dando lugar a la activación de las proteínas apoptóticas BH3, que activan tanto directa a) como indirectamente b) a BAK y BAX. La activación de estas dos proteínas proapoptóticas dará lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial con la subsecuente salida del citocromo C al exterior promoviendo la activación de la vía de las caspasas que desencadenará la apoptosis. La ruta extrínseca o de los receptores de muerte se inicia cuando los ligandos de muerte como FasL, TNF y TRAIL se unen a los receptores en la superficie celular activando a la caspasa 8. La activación de la caspasa 8 puede desembocar en la activación de la ruta de las caspasas y dar lugar a la apoptosis, o bien, derivar en la ruta intrínseca a partir de la proteína tBid.

3.3C. Senescencia celular durante el desarrollo embrionario

Se ha observado también, que en el proceso fisiológico de regresión tisular, está implicada la senescencia celular. En estos casos el envejecimiento celular se produce de forma similar a la senescencia producida por oncogenes, o en los tejidos del organismo adulto originados por diversos estímulos físicos o químicos (Storter et al., 2013; Muñoz-Espín et al., 2013 y 2014).

La senescencia es un proceso que impide que las células se dividan indefinidamente; se puede detectar a nivel celular tanto de forma fisiológica como patológica, y está ampliamente descrito en la supresión tumoral y en el envejecimiento de los tejidos del organismo adulto (Campisi, 2000; Lafferty-Whyte et al., 2009). Las señales que desencadenan la supresión de la proliferación son:

- El acortamiento de los telómeros, que se produce con la pérdida del DNA en los extremos cromosómicos derivada de las sucesivas duplicaciones celulares; este fenómeno es conocido como “erosión de telómeros” (Harley et al., 1990).
- La expresión de oncogenes (Kuilman et al., 2008)
- La exposición a estrés oxidativo (Pascal et al., 2005).
- La señalización inducida por daño al DNA (Parrinello et al., 2003).

Las células senescentes se caracterizan por la incapacidad de proliferar aún en presencia de nutrientes y mitógenos abundantes, manteniendo su actividad metabólica y su viabilidad celular (Campisi, 2000; Lafferty-Whyte et al., 2009).

Durante el desarrollo embrionario, a grandes rasgos, la senescencia celular desempeña un papel fundamental durante el proceso de remodelado tisular, el cual va precedido por la infiltración de macrófagos que procederán a la “limpieza” de las células senescentes (Storter et al., 2013; Muñoz-Espín et al., 2013 y 2014).

Las células senescentes embrionarias son no proliferativas y muestran un aumento significativo de la actividad de la enzima beta-galactosidasa (β -Gal), la cual está considerada como la marca distintiva de las células senescentes. Los genes claves inducidos en este proceso a partir de la respuesta persistente de daño al DNA (DNA damage response, DDR) originada como consecuencia del acortamiento de los telómeros, son los conocidos como represores tumorales p53/p21 y p16/RB

encargados de detener la proliferación y contribuir al mantenimiento del envejecimiento celular.

Las células senescentes secretan moléculas que comprometen el microambiente celular y tisular, que le otorga a la célula un fenotipo secretor asociado a la senescencia (senescence-associated secretory phenotype, SASP) integrado por quimiocinas, factores de crecimiento (TGF β , IGF1, IGFBP5, HGF, AREGB), proteasas (metaloproteinasas MMP2, MMP9 y ADAMSTS9), y citocinas inflamatorias (interleucinas: IL8L1, IL8L2), las cuales pueden actuar de manera conjunta y propagar la senescencia de manera autocrina y paracrina (Acosta et al., 2013; Kuilman y Peeper, 2009). Estas moléculas tienen como función principal perpetuar el estado antiproliferativo y fomentar la eliminación de las células senescentes previa inflamación local, como respuesta a la citada secreción celular, que conducirá a la eliminación de las células por fagocitosis dando lugar a la remodelación del tejido y la reparación del daño (Freund et al., 2010; Hoenicke y Zender, 2012; Krizhanovsky et al., 2008).

3.3D. Estudios de microRNA que influyen en la apoptosis durante el desarrollo embrionario

La mayoría de estudios sobre la influencia de los microRNA en la apoptosis celular que da lugar a la remodelación de los órganos, durante la etapa embrionaria, se han realizado en *Drosophila melanogaster* (Alvarez-García y Miska, 2005; Leaman et al., 2005; Walker y Harland, 2009; Bejarano et al., 2010; Zhang et al., 2012), pez cebra (*Danio rerio*; Le et al., 2009), y en embriones de ratón (*Mus musculus*; Pernaute et al., 2014), tal como podemos observar en la tabla 2.

Proceso	MicroRNA	Dianas génica	Función	Referencia
<i>Drosophila (D.melanogaster)</i>				
Control del crecimiento y muerte celular programada	bantam	hid	Proliferación y muerte celular programada	Brennecke et al., 2003
Muerte celular programada	miR -14	DS	Muerte celular programada	Xu et al., 2003
Embriogénesis y muerte celular programada	miR -2 miR-6 miR-11 miR-13 miR-308	DS	Muerte celular programada	Leaman et al., 2005
Desarrollo de la retina neural	miR -24a	Caspasa-9 Apaf1	Disminución de la apoptosis	Walker y Harland, 2009.
Desarrollo del ala	miR -9a	Lim-only	Prevención de la apoptosis	Bejarano et al., 2010
<i>Pez cebra (Danio rerio)</i>				
Embriogénesis y apoptosis	miR -125b	P53	Regulación de la apoptosis	Le et al., 2009
<i>Ratón (Mus musculus)</i>				
Septación pulmonar	miR -134	DS	Proliferación celular, apoptosis y migración celular	Zhang et al., 2012
Regulación de la supervivencia de las células madre multipotentes	miR -19 miR -20 miR -92 miR-302	BIM	Regulación de la muerte celular programada	Pernaute et al., 2014

Tabla 2: influencia de los microRNA durante la remodelación tisular, en la etapa embrionaria.

4. FORMACIÓN DE LA EXTREMIDAD

4.1. Características generales

El patrón esquelético de las extremidades es muy similar entre los diferentes vertebrados tetrápodos (Anfibios, Reptiles, Aves y Mamíferos), evidencia que sugiere la presencia de un ancestro común para estos grupos de animales, ya que sus estructuras han sido identificadas también en animales fósiles (ver figura 11).

El esqueleto apendicular de los tetrápodos, también denominado quiridio, está compuesto por tres partes:

1. La parte basal o **estilopodio** formado por el húmero (extremidades superiores) o fémur (extremidades inferiores), y estos se unen al tronco a través de la articulación escapulo-humeral o coxofemoral, respectivamente.
2. La parte media o **zeugopodio**, compuesta por el cúbito y el radio (extremidad superior), o bien, por la tibia y el peroné (extremidad inferior).
3. La distal o **autopodio**, es la parte del miembro que establece contacto con el suelo. Es un poco más compleja ya que está formada por más elementos y está dividida en:
 - *Basipodio*: carpos y tarsos, es decir, muñecas y tobillos según pertenezcan a la extremidad superior o inferior.
 - *Metapodio*: metatarsos y metacarpos, palma de la mano o planta del pie respectivamente.
 - *Acropodio*: formado por las falanges articuladas de los dedos de ambos pares de extremidades (Fischer et al., 2006).

No obstante no se puede obviar que, a pesar de estas similitudes derivadas del ancestro común, las diferentes vías evolutivas han originado diferencias notables en cuanto a la forma y longitud de los huesos se refiere.

La diferencia más evidente la hallamos en la parte distal de la extremidad, el autopodio, que varía dependiendo de las citadas adaptaciones evolutivas al medio habitado por cada especie.

Los aspectos más reseñables que confieren las características específicas al autopodio de cada especie podemos clasificarlas en tres:

1. Presencia (como en el caso de los animales adaptados al medio acuático, como los patos, tortugas, o en animales adaptados al vuelo como los murciélagos) o ausencia (dedos libres como en el caso de los primates) de membranas interdigitales.
2. El número de dígitos presentes en cada especie, siendo, hoy en día, 5 los de mayor número, como en el caso de los primates y ratones por ejemplo, reduciéndose su número desde los dedos periféricos I y V progresivamente hasta quedar en un solo dígito, el III, como en el caso de los perisodactilos (Équidos).
3. La longitud de los dedos, la cual varía según el número de falanges por dígito (Montero y Hurlé, 2007).

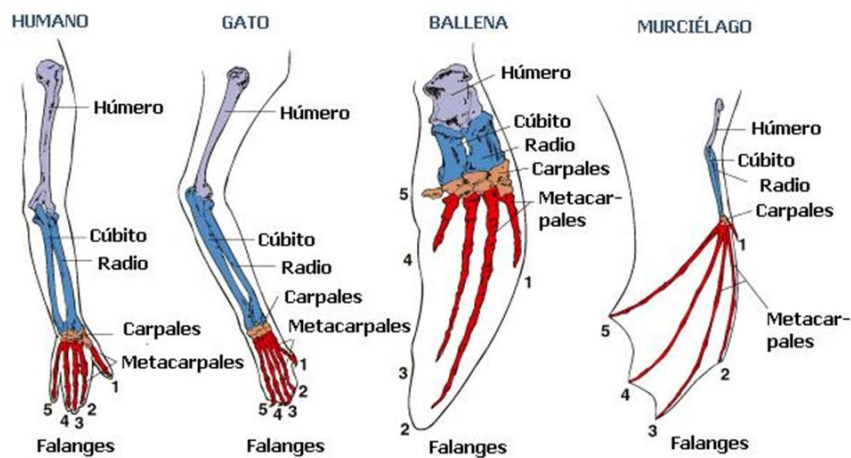


Figura 11: órganos homólogos en extremidades anteriores de vertebrados. (modificado de <http://www.sindioces.org/cienciaorigenes/bioevo.html>)

Los órganos homólogos son aquellos que tienen un origen evolutivo y embrionario común, aunque a través de los diferentes cambios sufridos derivados de las diversas adaptaciones al medio (presión evolutiva) han adquirido diferente forma y función.

Primera: extremidad superior humano, brazo. Segunda: extremidad delantera del gato, pata delantera. Tercera: aleta dorsal de la ballena. Cuarta: ala del murciélago.

4.2. Desarrollo

Los esbozos primarios de las extremidades del embrión de pollo podemos observarlos a partir del estadio 18HH, aunque las primeras áreas de condensación celular en las zonas donde se sitúa la extremidad aparecen a partir del estadio 15HH (Hamburger y Hamilton, 1951).

Estos esbozos primarios están formados principalmente por dos componentes estructurales que interactúan entre sí para dar lugar al desarrollo completo de la unidad funcional. Dichos componentes son: un núcleo mesodérmico donde se establece la zona distal de progreso (PZ; ver figura 12, imágenes A y B), formada por células con capacidad de proliferación e indiferenciadas, cubiertos por una capa de células ectodérmicas que se engrosa en el margen distal constituyendo la denominada cresta ectodérmica apical (AER; ver figura 12, imágenes A y B), que envuelve a la PZ (Macías et al., 1997; Merino et al., 1999) y que recubre al núcleo mesodérmico.

La AER está formada por un epitelio columnar pseudoestratificado con un peridermo suprayacente (Fallon y Kelly, 1977). Según identificó Saunders en sus experimentos en 1948, es esencial para el desarrollo de la extremidad, ya que su escisión, da lugar a la no formación de los elementos distales, siendo más o menos acusada su ausencia, según el estadio de desarrollo embrionario en el que se elimine (Saunders et al., 1948). Por lo tanto, la progresión del crecimiento y la diferenciación celular de la extremidad depende, estrictamente, de las interacciones que se producen entre el mesodermo y el ectodermo. Estas interacciones son las responsables de coordinar la proliferación, diferenciación celular y, finalmente, la muerte de las células indiferenciadas, dando lugar a la remodelación del miembro (Macías et al., 1997; Merino et al., 1999).

La proliferación celular de la PZ ocurre en dirección próximo distal siendo esta zona la última en perder su “potencial morfológico” manteniendo, de esta manera, el progreso de la extremidad.

Como hemos comentado, la muerte celular remodela la extremidad. Ya desde los primeros estadios del desarrollo de los esbozos primarios podemos encontrar áreas

que exhiben muerte celular, estas reciben el nombre de: “zona necrótica anterior” (ANZ), la zona “necrótica posterior” (PNZ) y la “zona opaca” (OP). Estas áreas muestran un patrón temporal y espacial de distribución, coordinado con el establecimiento de la morfología esquelética de la extremidad (Hinchiffe, 1982). En estadios más avanzados del desarrollo, una vez que termina de formarse el molde de la extremidad, surgen otras áreas de muerte en las zonas interdigitales que reciben el nombre de “zonas necróticas interdigitales” (INZ, ver la figura 12 B). Estas zonas están presentes en todos los animales amniotas y su distribución espacio/tiempo es dependiente de la morfogénesis de los dedos de cada especie, es decir, es mucho más extensa en aquellos animales que presentan en su fisionomía normal dedos libres, como por ejemplo, el pollo (Patou, 1975; Saunders y Fallon, 1967), o menos extensa en aquellos animales que presentan membranas interdigitales, como por ejemplo, el pato (*Anas platyrhynchos*; Saunders y Fallon, 1967; Hurlé y Colveé, 1982). La función de las zonas necróticas interdigitales es la de terminar de esculpir la forma final de la extremidad.

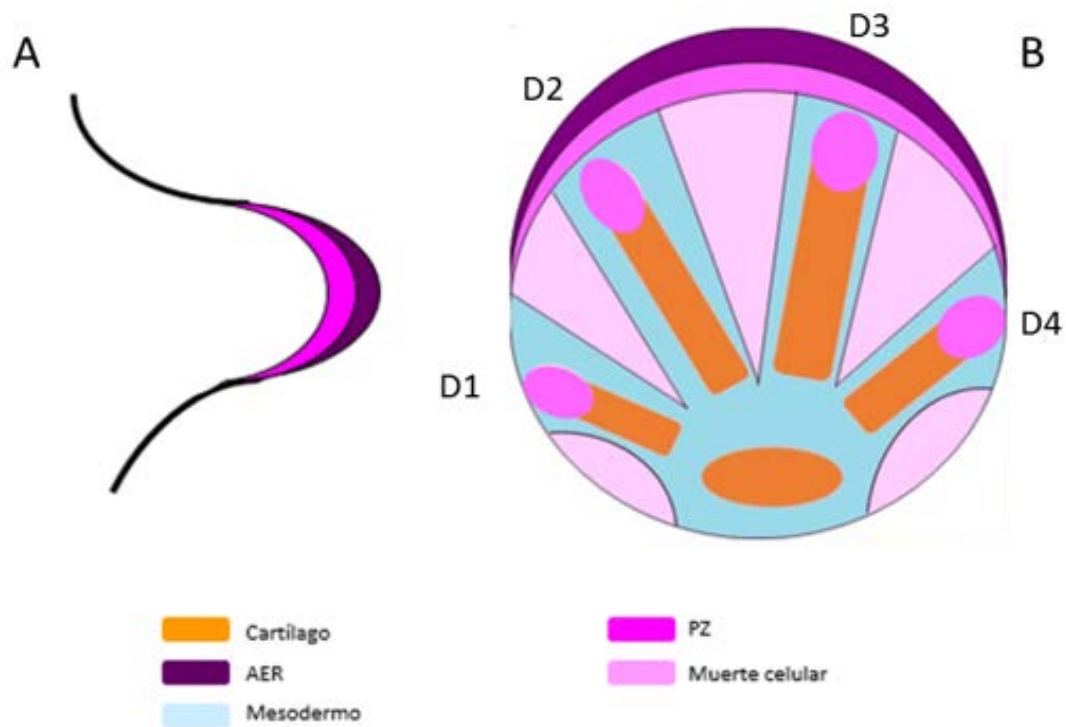


Figura 12: imagen esquematizada de la pata del embrión de pollo.

- Vista lateral del esbozo inicial de la extremidad del embrión de pollo en la que podemos apreciar la zona de progreso recubierta por la capa de células ectodérmicas que conforman la AER.
- Representación esquemática de un autopodio de embrión de pollo, donde pueden verse diferenciadas las áreas de formación del cartílago, las cuales darán lugar a las formaciones esqueléticas de los dedos (D1-D4); el área de progreso de la extremidad, recubiertas por la cresta ectodérmica apical (AER) y las zonas necróticas gracias a las cuales se remodelará la extremidad.



OBJETIVOS

Tal como se expone de manera detallada en el presente apartado de esta Tesis, en la última década, los RNA no codificantes de pequeño tamaño como los microRNA, siRNA o piRNA (small interfering RNA, piwi associated RNA, por sus siglas en inglés), han adquirido gran importancia como reguladores epigenéticos del desarrollo y la diferenciación celular. Los hallazgos obtenidos han supuesto el descubrimiento de nuevos mecanismos de regulación en la expresión génica mediada por pequeños RNA de 20-30 nucleótidos de longitud (Carthew and Sontheimer., 2009).

Los microARN regulan negativamente la expresión de sus genes diana (Krol et al., 2010) degradando, o bien, reprimiendo la transcripción de los RNA mensajeros (mRNA). La especificidad de la degradación está mediada por una zona de la cadena del microRNA denominada “seed region” (región semilla), de aproximadamente 7 nt que se encuentra en el extremo 5’ (Bartel, 2004).

Entre los modelos de desarrollo en los que han sido estudiados, destacan: la gametogénesis, la etapa de preimplantación del ovocito, la hematopoyesis, y el desarrollo del sistema nervioso y circulatorio (Ahmed et al., 2015; Lopez-Sanchez et al., 2015; Bhattacharya et al., 2016). En estos modelos, están implicados en eventos que determinan la función y diferenciación celular.

El posible papel que pueden desempeñar los microRNA en la regulación de la muerte celular programada, relacionada con la morfogénesis y diferenciación tisular durante la etapa embrionaria, aún no es bien conocido (Lorda-Diez et al., 2015a).

En contraste, los análisis funcionales de microRNA en la regulación de la muerte celular en los tejidos tumorales, ha despertado un gran interés. Se ha comprobado que algunos microRNA pueden modular la progresión de los tumores al interferir en la sensibilidad celular al tratamiento con quimioterapia (Magee et al., 2016). Otros microRNA, regulan este mismo proceso al tener como dianas genes relacionados con las vías apoptóticas, los cuales están asociados con la carcinogénesis, malignización y metástasis tumoral (Pileczki et al., 2016; Wang et al., 2016). Los microRNA, también pueden inhibir el crecimiento del tumor y su metástasis, promoviendo la muerte celular a través de la regulación negativa de la expresión de factores antiapoptóticos como Bcl-2 o Bcl-XL (Cimmino et al., 2005;

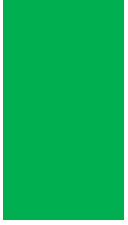
Ji et al., 2013). Estos, suelen presentar baja expresión en una gran variedad de linajes tumorales.

Los microRNA están funcionalmente asociados al estrés oxidativo (Mikhed et al., 2015) —característica importante en los procesos degenerativos del embrión (Covarrubias et al., 2008; Lorda-Diez et al., 2015b) —.

Cabe destacar, que en algunas poblaciones celulares, como respuesta al estrés oxidativo, el nivel de varios microRNA se encuentra elevado, y que su sobreexpresión “in vitro”, en células endoteliales, conduce a senescencia y a apoptosis (Magenta et al., 2016).

Además de la regulación directa de las cascadas moleculares apoptóticas, la regulación de la apoptosis por microRNA puede tener lugar de forma indirecta, mediante la regulación de las rutas de señalización que influyen en la apoptosis. De esta forma, encontramos que miR-21 y miR-590-5p regulan efectores intracelulares de la ruta de TGF β (Lan et al., 2014; Li et al., 2013; Jafarzadeh y Soltani, 2016), mientras que miR-140-5p y miR-130 regulan la ruta de BMP2 en la etapa embrionaria de los vertebrados (Lopez-Sanchez et al., 2015; Gan et al., 2016). Así mismo, los microRNA pueden estar involucrados en el daño al ADN y en senescencia, dos procesos de degradación asociados a la muerte celular programada en el embrión (Lorda-Diez et al., 2015 a y b).

Los hechos mencionados apoyan la existencia del papel potencial que poseen los microRNA como señales reguladoras durante la muerte celular embrionaria. En base a ello, el presente trabajo, ha sido diseñado con el objetivo de identificar aquellos microRNA involucrados durante este proceso. Para ello, se seleccionó el tejido del espacio interdigital de las extremidades en desarrollo. Este tejido, se caracteriza por sufrir, durante el transcurso del desarrollo embrionario (en animales con dedos libres), apoptosis masiva, inhibición del crecimiento, senescencia celular y degradación de la matriz extracelular (Lorda-Diez et al., 2015a; Hurlé et al., 1996). Además, la remodelación del interdígito está estrechamente regulada por miembros de la vía de señalización de TGF β .



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS ANIMALES

En la presente tesis se han empleado embriones de pollo (*Gallus gallus*) y pato (*Anas platyrhynchos*) procedentes de huevos fecundados, adquiridos en la granja “Santa Isabel” (Córdoba).

Los huevos se incuban a 37,5°C y 50%HR durante los días que sean necesarios hasta alcanzar el estadio considerado óptimo, según requiera cada experimento.

2. EXTRACCIÓN DEL TERCER INTERDÍGITO DE LA PATA DEL EMBRIÓN DE POLLO Y PATO

Los estadios que consideramos óptimos, para la disección del tejido presente en el espacio interdigital en los embriones de pollo, son:

- Estadio 29HH, corresponde a los 6 días posincubación (PI), es anterior al inicio de la muerte en la zona del interdígito.
- Estadio 32HH, corresponde a los 7,5 días PI, coincide con el momento en el que se produce la muerte celular en la zona del interdígito.

Los estadios seleccionados, en los embriones de pato, son:

- 7,5-8d PI que, según nuestras observaciones, coincide con el momento previo al inicio de la muerte celular en el tejido interdigital.
- 10,5/10,75d PI que corresponde con el momento de la muerte celular en el tejido del espacio interdigital.
- 11/11,5d PI, fin del remodelado tisular (no se observa muerte celular tras teñir con rojo neutro).

Una vez alcanzado el estadio deseado (en ambas especies), los huevos se retiran de la incubadora y se dejan reposar una hora a temperatura ambiente.

Antes de iniciar las correspondientes manipulaciones, se pulveriza sobre ellos alcohol etílico al 70% de concentración para su desinfección y se recolectan, los embriones, en una placa de Petri con PBS estéril.

Las patas del embrión se diseccionan y transfieren a otra placa de Petri con PBS estéril. En esta segunda placa, se fija la pata con unas pinzas de relojero en posición dorsal y empleando un iridiotomo, se realizan dos incisiones, entre el cuarto y tercer dedo, para extraer el tejido.

Los interdígitos se introducen en un eppendorf de 1,5ml a -78,5°C (hielo seco), para evitar el deterioro del RNA.

El RNA se extrae con TRIzol, técnica que se explicará más adelante.

3. IDENTIFICACIÓN DE MICRORNA

3.1. Secuenciación masiva microRNA

Se ha realizado una secuenciación masiva de microRNA, a partir de muestras formadas por doce interdígitos extraídos de las patas de los embriones de pollo, en los estadios 29HH y 32HH.

Para la extracción de microRNA de los interdígitos, utilizamos el kit de extracción “mirPremier miRNA isolation kit” (Sigma). Las concentraciones y calidad del RNA han sido determinadas por el bioanalizador “Agilent 2100 (Agilent Technologies)” con el nanochip “RNA6000 Nano chip”. Seguidamente, se han preparado las librerías de DNA complementario (cDNA) para la generación de clusters, utilizando “Illumina TreSeq small RNA sample Preparation protocol”. Las secuencias de cDNA se han analizado con el bioanalizador “Pippin Sage system (Sage Science)” después de su purificación.

Las librerías resultantes han sido analizadas mediante cuantificación absoluta por qPCR para determinar el número total de copias de cada microRNA y se han secuenciado en el “Beijing Genomics Institute”.

Para la identificación de los microRNA, sus secuencias se han comparado con las secuencias de referencia de la base de datos de microRNA de la base “Ensembl v. 74 genome assembly Galgal4”.

4. CULTIVOS CELULARES

En los cultivos celulares utilizados en esta tesis se han empleado células mesodérmicas indiferenciadas, obtenidas de la zona de progreso (PZ) de los autopodios en desarrollo de las extremidades superiores e inferiores de los pollos de estadio 25 HH, que corresponde a los 4,5 días PI.

Para la obtención de las células, los embriones se recolectan en placas de Petri que contienen PBS estéril y se transfieren a medio de cultivo L-15 (Leibovitz Medium; Lonza) 1% penicilina/estreptomicina. Una vez inmersos en este medio, se disecciona el tejido del autopodio, a partir del cual se obtendrán las células.

El tejido se disgrega mediante digestión enzimática incubando, en primer lugar, durante 6 minutos a 37°C y 5%CO₂ con tripsina al 0,25% de concentración, y en segundo lugar, con colagenasa al 0,25% de concentración durante 12 minutos, en las mismas condiciones. Pasado este tiempo, el medio se extrae y se añade 1ml de DMEM (Dublecco's Modified Eagle Medium; Lonza) 1% penicilina/estreptomicina, suplementado con suero bovino fetal al 10% (Foetal Bovine Serum, FBS), para parar la digestión enzimática. Se pipetea cuidadosamente, terminando de disgregar el tejido, y se filtra por una red de muselina de nylon que separa las células de restos de agregados. El medio junto con las células, se centrifugan a 150rpm durante 10 minutos.

En este momento las células pueden electroporarse, con el fin de sobreexpresar algún gen, microRNA, etc. Técnica que será explicada más adelante y/o ser cultivadas a diferentes densidades añadiendo, si el experimento lo requiere, algún factor al medio.

4.1. Cultivos de alta densidad o micromasas

En el presente estudio se han utilizado cultivos celulares en alta densidad (también conocidos como micromasas), de células mesenquimáticas procedentes del autopodio del embrión de pollo.

Una vez centrifugadas las células, se resuspenden en DMEM 10%FBS 1%penicilina/estreptomicina, en un volumen que de una concentración de 3×10^5 células/10 μ L, entonces, se disponen en placas de cultivo “Nuncclon” de 48 pocillos (Nunc), dejando los pocillos exteriores con PBS estéril.

Las placas se incuban con DMEM 10%FBS 1%penicilina/estreptomicina durante una hora y media en la estufa a 37°C y 5%CO₂. Posteriormente, se añaden 200 μ L de medio DMEM 1%penicilina/estreptomicina a cada pocillo y se incuban, el tiempo requerido para cada experimento.

4.2. Cultivos de baja densidad o monocapa

Para estudiar el efecto de las sobreexpresiones o inhibiciones de la expresión de los microRNA, una vez electroporadas las células con los diferentes pre-miR o anti-miR, se han mantenido en un cultivo de baja densidad.

Para nuestros cultivos de células mesenquimáticas del autopodio del embrión de pollo, hemos sembrado 15×10^5 células por pocillo en placas de 12 pocillos “TPP® tissue culture plates”.

Las células se incuban con 200 μ L DMEM 10%FBS 1%penicilina/estreptomicina durante una hora y media en la estufa a 37°C y 5%CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se añaden 800 μ L de medio DMEM 1%penicilina/estreptomicina sin FBS a cada celda y se vuelven a incubar el tiempo requerido para cada experimento.

5. TINCIONES

5.1. Azul Alcian

Eventualmente hemos valorado la formación de nódulos de cartílago en cultivos de micromasas para ello se han realizado tinciones de Azul Alcian.

Las micromasas de 2, 4 y 6 días de cultivo se fijan en Fijador de Khale’s durante 15 min. Posteriormente, se lavan 3 veces durante 5 minutos con PBS y se añade la

solución colorante Azul Alcian al 0,5% en alcohol ácido (24h). Transcurrido este tiempo, se lavan 2 veces con HCl 0,1N durante 5 minutos y se dejan en PBS para observar y fotografiar la formación de nódulos de cartílago en una lupa Nikon SMZ1500 provista de cámara digital Nikon DXM1200C con software de fotografiado Nikon ACT-1C.

5.2. Rojo Neutro

Es un colorante vital para la valoración ácido-base que se ha utilizado, en esta tesis, para poner de manifiesto el patrón de muerte celular que se produce durante el desarrollo embrionario. Para ello, se han extraído las patas, tanto de pato como de pollo, en los estadios deseados y tras añadir una disolución de 100µl de rojo neutro 0,2N/1ml PBS, se dejan incubar, aproximadamente, 10 minutos a 37°C. Cuando las patas adquieren la tonalidad deseada, se lavan en PBS y se fijan en formol cálcico a 4°C. Transcurridas 12 horas, las muestras se deshidratan, efectuando 2 pases de una hora a 4°C en 2-Propanol y se transparentan utilizando Xilol a 4°C.

6. TRATAMIENTOS DE CULTIVOS DE MICROMASAS

6.1. Factores de crecimiento

Para algunos experimentos, las micromasas fueron incubadas añadiendo al medio de cultivo distintas concentraciones de proteínas recombinantes. Los morfógenos utilizados fueron BMP2 a una concentración de 200ng/ml, Noggin a 200ng/ml, IGF1 a 100ng/ml y TGFβ3 a 0,01ng/ml.

6.2. Reguladores de los factores de crecimiento

En este caso se ha utilizado SIS3 a una concentración 10mM

6.3. Estrés oxidativo

Para comprobar como afectaba el estrés oxidativo en la regulación de los diferentes microRNA descritos en esta tesis, las micromasas se incubaron añadiendo, al medio de cultivo, un agente oxidante, el peróxido de hidrógeno, a una concentración de 0,4mM.

7. ELECTROPORACIÓN DEL PRE-MIR/ANTI-MIR

Como hemos mencionado anteriormente, las células obtenidas para realizar los diferentes tipos de cultivos pueden electroporarse con el fin de sobreexpresar algún gen o microRNA. Para ello, una vez recolectadas las células tras su centrifugación, se diluyen en un volumen suficiente de L-15 que permita separar 15×10^5 células (número de células por electroporación) y se centrifugan a 1500rpm durante 10 minutos. A continuación, se diluyen, las células, en 400µL (volumen por cubeta de electroporación) de buffer isoosmolar de electroporación con el pre-miR o Anti-miR de interés.

Los pre-miR y anti-miR utilizados en esta tesis son los que se encuentran representados en la tabla 3.

MicroRNA	Pre-mir /Anti-mir	Identificación	Marca
hsa-mir-21	Anti-mir miRNA inhibitor	ID:AM10206	Ambion
hsa-mir-21-5P	Pre-mir miRNA precursor	ID:PM10206	Ambion
hsa-mir-144	Pre-mir miRNA precursor	ID:PM12631	Ambion
gga-mir-451	Pre-mir miRNA precursor	ID:PM10789	Ambion

Tabla 3: pre-miR y anti-miR utilizados en la sobreexpresión/inhibición de los correspondientes microRNA.

La mezcla se añade en una cubeta de electroporación (Sigma-Aldrich® electroporation cuvettes) y se introduce en el electroporador (eppendorf Multiporator) a 260v 150µs 4 pulsos. Una vez electroporadas las células, el contenido de la cubeta se traspa a un eppendorf de 1,5ml con 400 µL de DMEM

10%FBS 1%penicilina/estreptomicina y se centrifuga a 1500rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se cambia el medio por 200 μ L de DMEM 10%FBS 1%penicilina/estreptomicina para sembrar las células en un pocillo de una placa “TPP® tissue culture plates”, durante 1h 30min.

Transcurrido este tiempo se añaden 800 μ L de DMEM 1%penicilina/estreptomicina a cada pocillo y se deja incubando el tiempo requerido para el experimento.

Como control negativo, en nuestros experimentos, las células se electroporaron con el “negative control # Sigma-Aldrich®”.

8. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

La extracción de RNA total de esta tesis, tanto de tejidos como de células, se ha efectuado con trizol (TRIzol® Reagent de Ambion, life technologies).

El trizol es una solución monofásica de fenol, guanidina isothiocyanato y otros componentes, que facilitan la extracción de moléculas de RNA de diferentes tamaños, manteniendo su integridad e inhibiendo la actividad RNasa; al mismo tiempo, desestructura las células y disuelve los componentes celulares durante la homogenización de la muestra.

- Para la extracción de RNA con trizol es necesario, además del trizol:
 1. Cloroformo.
 2. Alcohol isopropílico.
 3. Alcohol 75% disuelto en agua DEPC.
 4. Agua libre de RNasas.
 5. Centrifuga con potencia suficiente para 12.000rpm.
 6. Tubos de polipropileno para microcentrífuga.
- Para extraer el RNA de la muestra de interés, el primer paso es homogenizar la muestra; para ello es necesario:
 1. Incluir nuestra muestra en un tubo Eppendorf de 1,5mL y añadir 0,5ml de TRIzol.
 2. Mezclar suavemente con la pipeta.
- Posteriormente, para separar los diferentes componentes celulares, se requiere:

1. Incubar la muestra homogeneizada durante 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.
2. Centrifugar la muestra a 12000rpm durante 10 minutos a 4°C.
3. Recoger el sobrenadante y traspasarlo a un nuevo eppendorf.
4. Añadir 100ul de cloroformo, tapar perfectamente el tubo.
5. Agitar fuertemente durante 15 segundos en el agitador vórtex. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical.
6. Centrifugar las muestras a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. Después de centrifugar, la mezcla se separa en 3 fases: una fase inferior roja de fenol cloroformo; una interfase blanquecina, que contiene las proteínas y una fase incolora superior, la cual contiene exclusivamente el RNA (figura 13).

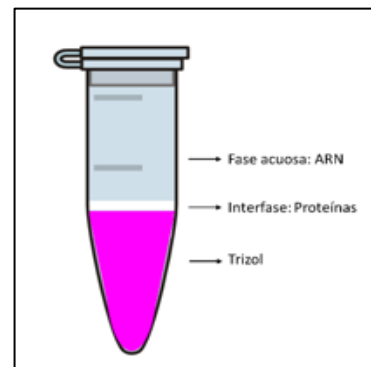


Figura 13: separación de las diferentes fases.

- Para precipitar el RNA:
 1. Transferir la fase acuosa cuidadosamente a un nuevo eppendorf.
 2. Añadir 0,25 mL de isopropanol para precipitar el RNA de la fase acuosa.
 3. Agitar fuertemente durante 15 segundos en vortex.
 4. Incubar la mezcla 30 minutos en hielo y en posición vertical.
 5. Centrifugar a 12000rpm 15 minutos a 4°C
 6. El RNA queda en el fondo del eppendorf formando un pellet.
- Para la fase de lavado del pellet de RNA:
 1. Retirar el sobrenadante cuidadosamente.
 2. Añadir 1 mL de etanol al 75% al pellet para lavarlo.
 3. Centrifugar a 6000rpm por 5 minutos a 4°C.
 4. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
- Para diluir el RNA:
 1. Secar el pellet a temperatura ambiente.

2. Añadir 30ul de agua libre de RNasas (agua DEPC).
- Resuspender.

9. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Se ha realizado con el fin de obtener el cDNA correspondiente a partir del RNA purificado de las muestras.

9.1. Transcripción reversa de microRNA (miRT)

La concentración de RNA se ha cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop. Las muestras se han diluido en H₂O DEPC, hasta alcanzar una concentración de 20ng/μl

Se ha utilizado el kit “TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit”, el cual ha sido optimizado para producir cDNA para ensayos con “TaqMan®”. Los reactivos incluidos en este kit transforman, mediante retrotranscripción, el RNA en cDNA.

Cada RT, de forma independiente, contiene un volumen total de 15 μL que consiste en:

- 7 μL master mix (tabla 4).
- 3 μL de primeros específicos para cada microRNA para cada RT específica (tabla 5, 6a y 6b).
- 5 μL de muestra de RNA.

Reactivos	Volumen necesario de cada reactivo
100mM dNTP (con dTTP)	0,15 µL
Enzima transcriptasa inversa	1,00 µL
MultiScribe™, 50 U/µL	
10x Buffer RT	1,50 µL
Inhibidor de RNasa, 20 U/µL	0,19 µL
Agua libre de RNasa	4,16 µL
Volumen total	7,00 µL

Tabla 4: componentes del kit de RT para el análisis de microRNA.

RNA	Secuencia
gga-18S	Fw: ccatggtgaccacgggtaac Rv: ggatgtggtacgcgtttctca

Tabla 5: los primeros utilizados, a modo de control endógeno, han sido los correspondientes para el RNA ribosomal 18s de pollo.

MicroRNA	Secuencia 5p
hsa-miR-451	aaaccguuaccauuacugaguuu
hsa-miR-181a	aacauucaacgcugucggugagu
gga-miR-146c	ugagaacugaaauccauggacug
hsa-miR-144*	ggauaucaucauauacuguaag
oan-miR-92a-2*	agguugggaucaguugcaaugcu
hsa-miR-30a-5p	uguaaacaucucgacuggaag
hsa-miR-21-5p	uagcuuaucagacugauguuga

Tabla 6a: secuencias 5p de los primeros de microRNA utilizados en las miRT.

MicroRNA	Secuencia 3p
hsa-miR-213 (*)	accaucgaccguugauuguacc
gga-miR-146c*	aguccaugguauucaguucucu
hsa-miR-144	uacaguauagaugauguacu
hsa-miR-92	uauugcacuugucccgccug
hsa-miR-30a-3p	cuuucagucggauguuugcagc
hsa-miR-21-3p	caacaacagucgguaggcuguc

- (*) La secuencia 3p del microRNA hsa-miR-181a, también recibe el nombre de hsa-miR-213.
- No hay primer compatible para la secuencia 3p del microRNA miR-451 de pollo.

Tabla 6b: secuencias 3p de los primeros de microRNA utilizados en las miRT.

La RT se incuba en un termociclador “Gradient Palm-Cycler™ de Corbett”, con el programa correspondiente al kit “TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit”, que consta de diferentes pasos, que varían en su duración y temperatura, tal y como muestra la tabla 7.

La RT se almacena a -20°C una vez finalizado su uso.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	30 minutos	16 °C
2	30 minutos	42 °C
3	5 minutos	85 °C
4	∞	4 °C

Tabla 7: descripción de la duración y temperatura que alcanza el termociclador durante los diferentes pasos en la incubación de la RT.

9.2. Transcripción reversa de RNA

Se ha utilizado el kit “Invitrogen™ SuperScript™ VILO™”, cuya master mix incluye: enzima SuperScript™ III RT, RNaseOUT™, inhibidor de ribonucleasas recombinante, “random primers”, MgCl₂, y dNTPs en una fórmula buffer optimizada para realizar qRT-PCR con SYBR-GREEN.

Tal como muestra la tabla 8, cada RT, de forma independiente, contiene un volumen total de 20 µL, que consiste en:

Componentes	Volumen
Master mix “™ SuperScript™ VILO™	4 µl
RNA	5 µl
H ₂ O DEPC	11 µl

Tabla 8: componentes del kit de RT para el análisis génico.

La RT se incuba en un termociclador “Gradient Palm-Cycler™ de Corbett”, con el programa correspondiente al kit “TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit”, que consta de diferentes pasos, que varían en su duración y temperatura:

- 25°C durante 10 minutos.
- 42°C durante 60 minutos.
- 85°C durante 5 minutos.

En el caso de las muestras de extremidades y micromasas, utilizadas en esta tesis para el análisis de la expresión génica mediante qPCR, se miden las concentraciones de cDNA mediante el uso de un espectrofotómetro (Nanodrop Technologies ND-1000), y se diluyen con agua estéril Milli-Q hasta su concentración de uso en este tipo de experimentos (0,5ng/ml).

10. qPCR-RT

La técnica de PCR cuantitativa (qPCR) se usa para cuantificar cambios en la expresión de genes o microRNA, en muestras experimentales de esta tesis, con respecto a sus muestras control.

10.1. TaqMan qPCR-RT

El tipo de qPCR-RT escogida para medir diferencias en los niveles de expresión de los diferentes microRNA tanto, en el momento de la muerte celular programada en el tejido del interdígito como en cultivos celulares, fue TaqMan. Este tipo de qPCR-RT está basada en el uso de sondas específicas marcadas fluorescentemente.

Las sondas TaqMan suelen tener unos 20 pares de bases de longitud y se conocen también como sondas 5' nucleasas (ya que utilizan la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa).

Estas sondas, están marcadas con un fluoróforo en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado por la luz polarizada que proyecta el sistema de detección del termociclador, y un bloqueador de señal (quencher) en el extremo 3' que, debido a la proximidad con el fluoróforo, absorbe su fluorescencia e hibrida en la zona intermedia entre el primero directo (forward) y el inverso (reverse).

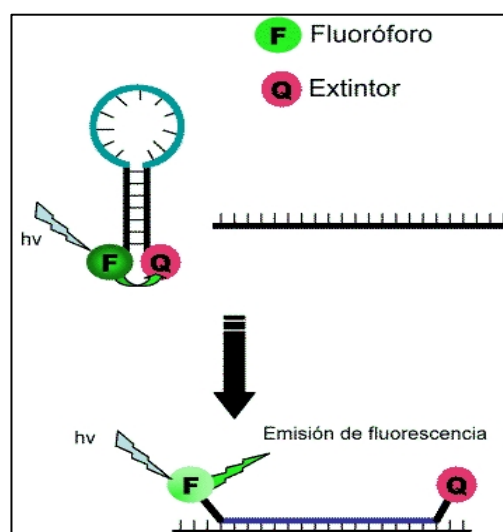


Figura 14: esquema de la actividad de la sonda TaqMan. Extraído de Tyagi y Kramer 1996

La actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa corta los nucleótidos de la sonda durante la amplificación, el fluoróforo se separa del quencher observándose la señal de fluorescencia, es decir, la hidrólisis

de la sonda da lugar al incremento en la señal del fluoróforo y ésta aumenta proporcionalmente al incrementarse el número de amplicones (figura 14).

A cada tubo de reacción inicial se le añaden, 1 µl de cDNA, 9 µl de stock (formado por 8,5 µl de agua DEPC y 0,5 µl de sonda específica para cada microRNA de interés) y 10 µl de TaqMan Master Mix (applied biosystems). Estos 20 µl se dividen entre dos tubos, obteniéndose para cada muestra 10 µl de mezcla de reacción.

Las condiciones de qPCR acotadas en el termociclador de “StepOnePlus™ Real-Time PCR System”, tal como podemos observar en la figura 15, son:

- Paso 1: Holding Stage, que consta de: un segmento de un ciclo de 50°C durante 2 minutos; seguido de un segmento 95°C 10 minutos.
- Paso 2: Cycling Stage compuesto por: 40 ciclos de 95 °C 15 segundos y 60°C 1 minuto.

Debido a la poca variabilidad mostrada en los experimentos, para normalizar los datos, se ha utilizado como control interno el RNA ribosomal de pollo gga-18S y los valores de cada muestra se han medido por duplicado en cada experimento.

El umbral de cada ciclo (Ct) de qPCR se define como el número de ciclos fraccionarios en los que la fluorescencia alcanza una línea de umbral fija. El nivel de expresión relativo se calcula usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001), que hace referencia a:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ Control endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ experimental} - \Delta Ct \text{ control}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Incremento de expresión del gen diana sobre el control}$$

Los niveles de expresión representan la media de 3 muestras duplicadas medidas de forma independiente bajo las mismas condiciones. Los resultados se han testado mediante los análisis estadísticos t-Student y ANOVA considerando el resultado

estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$. En las gráficas, el nivel de significación se representa de la siguiente manera: * o # para $p \leq 0,005$; ** o ## para $p \leq 0,01$ y *** o ### para $p \leq 0,001$.

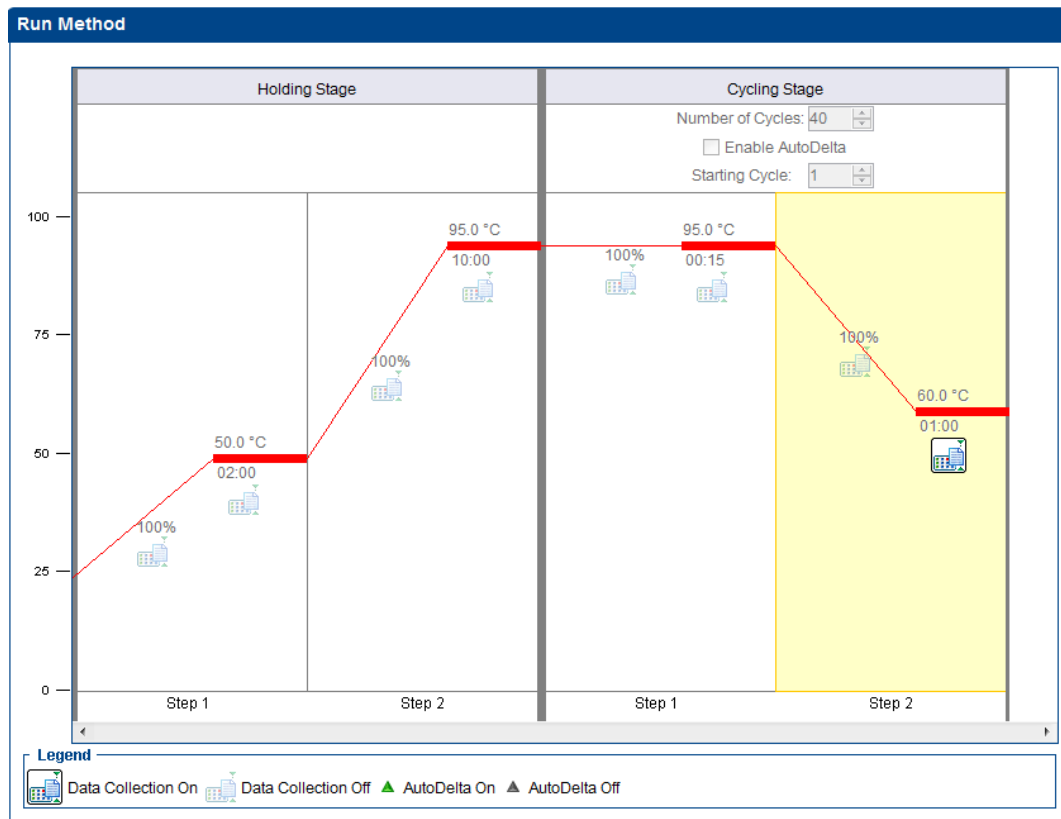


Figura 15: condiciones del ciclo térmico de la qPCR TaqMan. Imagen capturada del software step one V2.3 de qPCR en la que se muestra el perfil de temperaturas usado en los experimentos de qPCR TaqMan en esta tesis.

Las secuencias de los primers utilizados para las qPCR TaqMan son las mismas que las de miRT.

10.2. SYBR Green qPCR

El tipo de qPCR-RT escogida para medir los cambios en la expresión génica de las muestras control y experimental de esta tesis fue SYBR Green.

10.2B. Diseño de oligonucleótidos para qPCR-RT con SYBR Green

El diseño de oligonucleótidos primeros utilizados para cuantificar los niveles de expresión génica mediante qPCR-RT con SYBR Green, de las zonas de DNA de interés, se ha realizado mediante el programa informático “Sequence Analysis.exe” y la página web “the sequence manipulation suite”.

Se han escogido, de entre las opciones que oferta el programa, las parejas de primeros “forward/reverse” cuya longitud está en torno a las 20 bases, su porcentaje G-C es de aproximadamente el 50%, su T_m es de unos 60°C y, finalmente, que su composición no favorezca la aparición de bucles.

Una vez obtenidos los oligonucleótidos, se ha comprobado mediante “blastn suite” (nucleotide Basic Local Alignment Search Tool), que amplifican, únicamente, nuestro gen de interés.

Los primeros que se han utilizado para analizar los niveles de expresión génica por qPCR con SYBRGreen, se especifican en la tabla 9.

Nombre	Prímero
	Sentido (Fw)/Contrasentido (Rv)
ACVR2B	Fw: ggagcaatcaactccaacg Rv: ccactggaccatcaactgc
Aggrecan	Fw: aggagagacatcaggcatgg Rv: atctccagcactccagaagc
Bak	Fw: ctacgtcaccgaattcatgc Rv: aacattgtccagatcgagtgc
Bcl2	Fw: ttgtacggcaacagtatgagg Rv: ataagcgccaagagtgatgc
BMP2	Fw: tggaatgactggattgttc Rv: tggaattcaccgaattgacc
BMP7	Fw: aagcacgagctctatgtcagc Rv: cacagtaatacgagcatagcc
BTG1	Fw: gattggattgagcagtcagg Rv: gagccatcctctccaatacg
BTG2	Fw: gaggtctcataccgattgg Rw: tgcgacctatcatcatctgg
Col2a1	Fw: cagcatccagatgaccttc Rv: gtctcctcgtccatgtaggc
FGF10	Fw: atcgagaagaacggcaagg Rv: ggacttaactgccacaactcc
GDF5	Fw: acctgaagccaagggttagc Rv: agaccttcgcagtgtacgc
IGF1	Fw: ccagcagtagacgcttacacc Rv: ctctcaggtcacaactctgg
RPL13	Fw: aactcaagatggcaactcagc Rv: aaggccttgaagttcttctcc
Scleraxis	Fw: caccaacagcgtcaacacc Rv: caccaacagcgtcaacacc
SMAD7	Fw: ggctgtactctgtccaagagc Rv: cagctggcttctgtgtcc
SOX9	Fw: gaggaagtcggtgaagaacg Rv: gatgctggaggatgactgc
TGFβ2	Fw: tgcactgctatctcctgagc Rv: gcatgaactgatccatgtcg
TGFβR2	Fw: accgcactcacaagaagagg Rv: gttgatgtgttggtggcacagg

Tabla 9: primeros empleados en qPCR.

10.2C. qPCR-RT con SYBR Green

El SYBR Green se caracteriza por ser un fluoróforo con afinidad por el DNA, que al ser excitado, emite fluorescencia cuando está unido al DNA bicatenario. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del DNA de doble cadena. El complejo DNA-SYBR Green presenta un pico de excitación en $\lambda_{exc}=497\text{nm}$ y un pico de emisión en $\lambda_{em}=520\text{nm}$.

La qPCR se realiza en un termociclador “StepOnePlus™ Real-Time PCR System” y se analiza con el software de análisis “software step one V2.3”.

A cada tubo de reacción inicial se le añaden, 1 μl de cDNA a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 9 μl de stock, compuesto de: 8,2 μl de agua Milli-Q, y 0,4 μl de cada primero, sentido (Fw) y contrasentido (Rv), correspondientes al gen de interés, y 10 μl de SYBR Green Mix (Takara). Los 20 μl totales, se dividen entre dos tubos, obteniéndose para cada muestra 10 μl de mezcla de reacción.

Las condiciones de qPCR que hemos usado son:

- Paso 1: Holding Stage, que consta de un segmento de un ciclo de 95 °C durante 10 minutos.
- Paso 2: Cycling Stage, integrado por un segmento de 40 ciclos de 95 °C 30 segundos, 60 °C 1 minuto para anillamiento y 72°C 30 segundos para elongación.
- Paso 3: Melt Curve, compuesta por un ciclo a 95 °C 1 minuto y 30 segundos a 55°C y 30 segundos 95°C.

Las medidas de fluorescencia se toman al final de cada paso de anillamiento en el paso 2 y durante toda la subida de temperatura desde 55 °C hasta 95 °C en el paso 3 para realizar la curva de disociación, tal como muestra la figura 16.

Debido a la poca variabilidad mostrada en los experimentos se ha utilizado, para normalizar los datos, como control interno el gen RPL13, y los valores de cada gen se han medido por duplicado.

El umbral de cada ciclo (C_t) de qPCR, se define como el número de ciclos fraccionarios en los que la fluorescencia alcanza una línea de umbral fija. El nivel de expresión relativo se calcula usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (explicada anteriormente; Livak and Schmittgen, 2001).

Cada valor representa la media de 3 muestras duplicadas cada una de ellas, medidas de forma independiente bajo las mismas condiciones.

Los resultados se han testado mediante los análisis estadísticos t-Student y ANOVA, se ha considerado el resultado estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$.

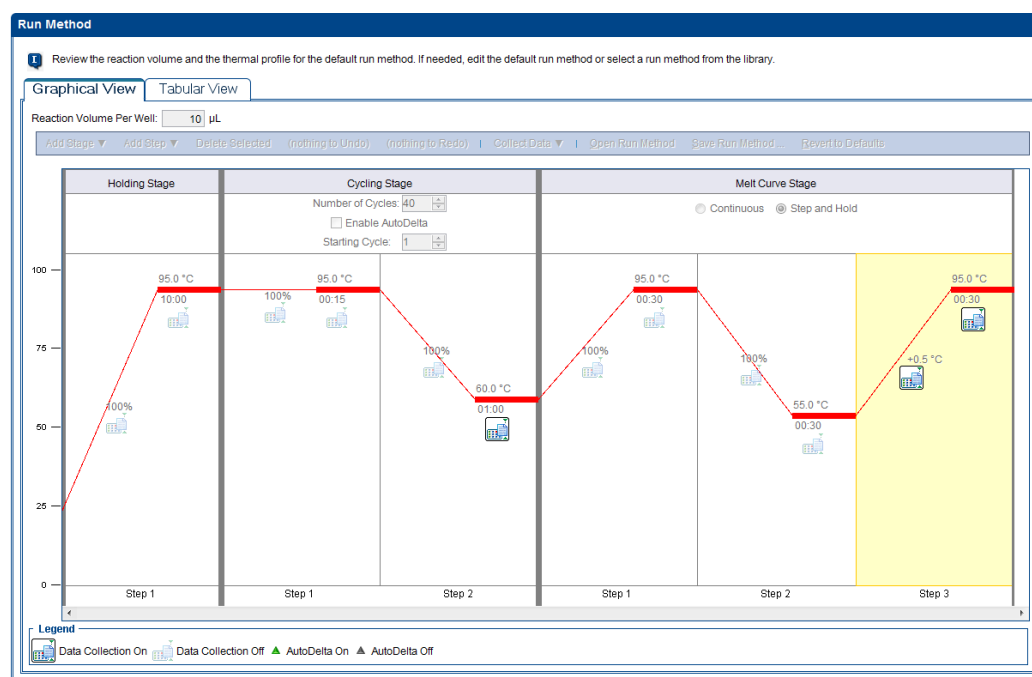


Figura 16: condiciones del ciclo térmico de la qPCR SYBR Green. Imagen capturada del software step one V2.3 de qPCR en la que se muestra el perfil de temperaturas usado en los experimentos de qPCR SYBR Green en esta tesis.

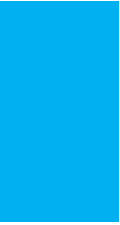
11. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para valorar los cambios tanto, en el ciclo celular como, en los procesos de muerte que han supuesto las electroporaciones de los diferentes pre-miR de interés, en las células electroporadas, se ha utilizado en este trabajo, la técnica de citometría de flujo.

La citometría de flujo, es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (1.500.000 células en nuestro caso). La información analítica de esta técnica abarca desde el análisis de la respuesta celular a determinados eventos, como el aislamiento de poblaciones celulares que expresan genes insertados artificialmente, al estado del ciclo celular, y prácticamente cualquier análisis que implique la distinción de determinadas células dentro de una población.

Para realizar las diferentes citometrías, se han mantenido los cultivos durante 48 horas. Posteriormente, las células se disocian con tripsina-EDTA (Lonza), se recolectan en un tubo de citometría y se centrifugan a 1500 rpm. 3 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavan con PBS y se vuelven a centrifugar para formar el pellet, que se resuspende y se fija en alcohol al 90%.

Una vez decidido el momento de ir al citómetro, para analizar nuestra muestra celular, centrifugamos las células a 1500rpm 3 minutos a 4°C y se añaden 250µl de una solución de citrato/BSA que contiene Ioduro de propidio (IP; 1mg/ml) y DNasa (1U/ml) para marcar las células. Se deja incubar unos minutos a temperatura ambiente protegido de la luz, y se analiza (previa filtración para evitar aglomerados celulares que puedan atascar el citómetro) en un “Becton Dickinson FacsCanto II” y utilizando el software “Cell Quest”.



RESULTADOS

1. PLANTEAMIENTO

Esta Tesis está enfocada a la búsqueda e identificación de microRNA implicados en los procesos que conducen a la muerte celular programada. Se ha seleccionado, para ello, un ejemplo concreto, donde la muerte celular desempeña un papel esencial en el remodelado anatómico. Este proceso morfogenético se produce durante el desarrollo embrionario, en el tejido presente en el interdígito, de especies con dedos libres.

La gran ventaja que nos ofrece, el uso de este modelo, es que conocemos con exactitud el dónde, el cuándo, y el cómo se produce la muerte celular.

2. SECUENCIACIÓN DE MICRORNA

La primera aproximación, en la caracterización de la expresión de los microRNA durante el proceso de regresión tisular, se ha realizado a partir de un análisis por secuenciación masiva de los RNA de pequeño tamaño —previa obtención de las muestras a partir de la disección del tejido presente en el interdígito—, en los estadios 29HH y 32HH. Estos estadios corresponden, respectivamente, al momento previo del inicio y al pico álgido de muerte celular que se produce en el tejido del interdígito de embriones de pollo (Figura 17 A y B). El objetivo de este estudio por secuenciación ha sido obtener el perfil de microRNA expresados durante la regresión del tejido presente en el espacio interdigital y la identificación de “posibles” nuevos microRNA implicados, también, en procesos de muerte celular. Gracias a ello se han detectado un total de 612 secuencias de microRNA de pollo (gga-microRNA) ya conocidos y 401 secuencias no clasificadas. Una vez obtenidos estos datos —para los siguientes análisis realizados en este trabajo—, hemos considerado solamente aquellos microRNA que superaban un umbral establecido de, al menos, 750 RPM (por sus siglas en inglés “reads per million”, lecturas por millón) detectadas a partir de la secuenciación, en alguno de los dos estadios seleccionados, para asegurar una expresión significativa de cada microRNA en las muestras de tejido. Basándonos en este corte, ha surgido una nueva lista integrada por 71 de los microRNA ya conocidos y 9 de las secuencias no identificadas.

En la figura 18, podemos observar un diagrama de expresión tipo “heatmap” donde hemos conjugado el nivel de expresión con el ratio de regulación de los microRNA seleccionados estableciendo 10 “cluster” (grupos) jerárquicos. Estos cluster, se han simplificado en base a su nivel de expresión y según su regulación (positiva o negativa), tal y como representan las tablas 10 y 11.

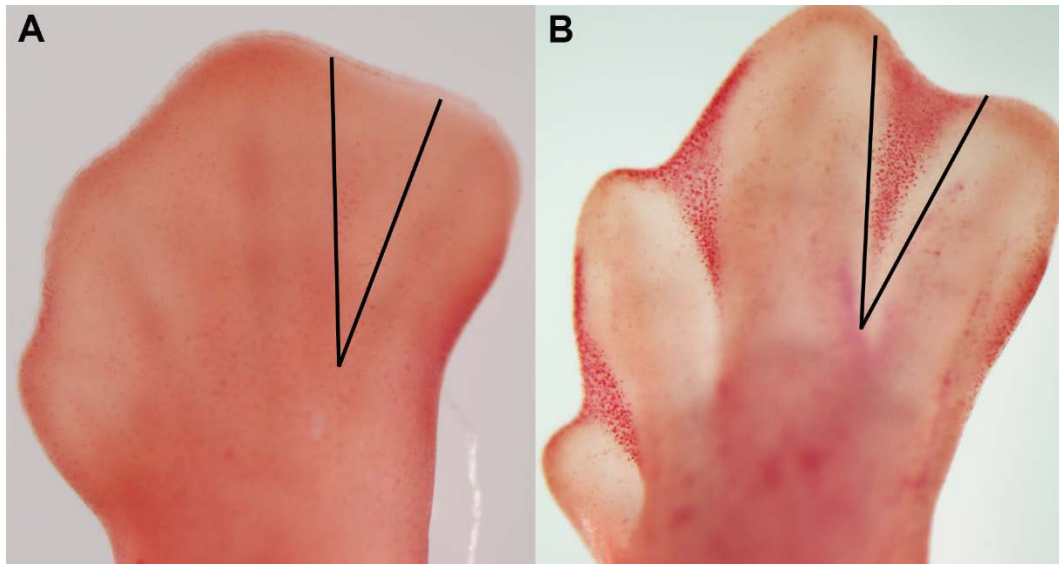


Figura 17: ilustra los autopodios, de la pata del embrión de pollo, correspondientes a los estadios 29HH (A) y 32HH (B), teñidos con rojo neutro.

Esta tinción vital pone de manifiesto la muerte celular que se produce en el tejido durante el proceso de desarrollo embrionario. Al comparar ambas imágenes y observar los espacios interdigitales podemos apreciar una coloración uniforme correspondiente a la ausencia de muerte celular en “A”, al contrario que en la extremidad en “B”, donde se aprecia un marcaje rojo intenso granulado, propio de este tipo de tinción, de las células apoptóticas. Las líneas negras muestran el tejido seleccionado para la disección y análisis en nuestro estudio, que corresponden al tercer interdígito.

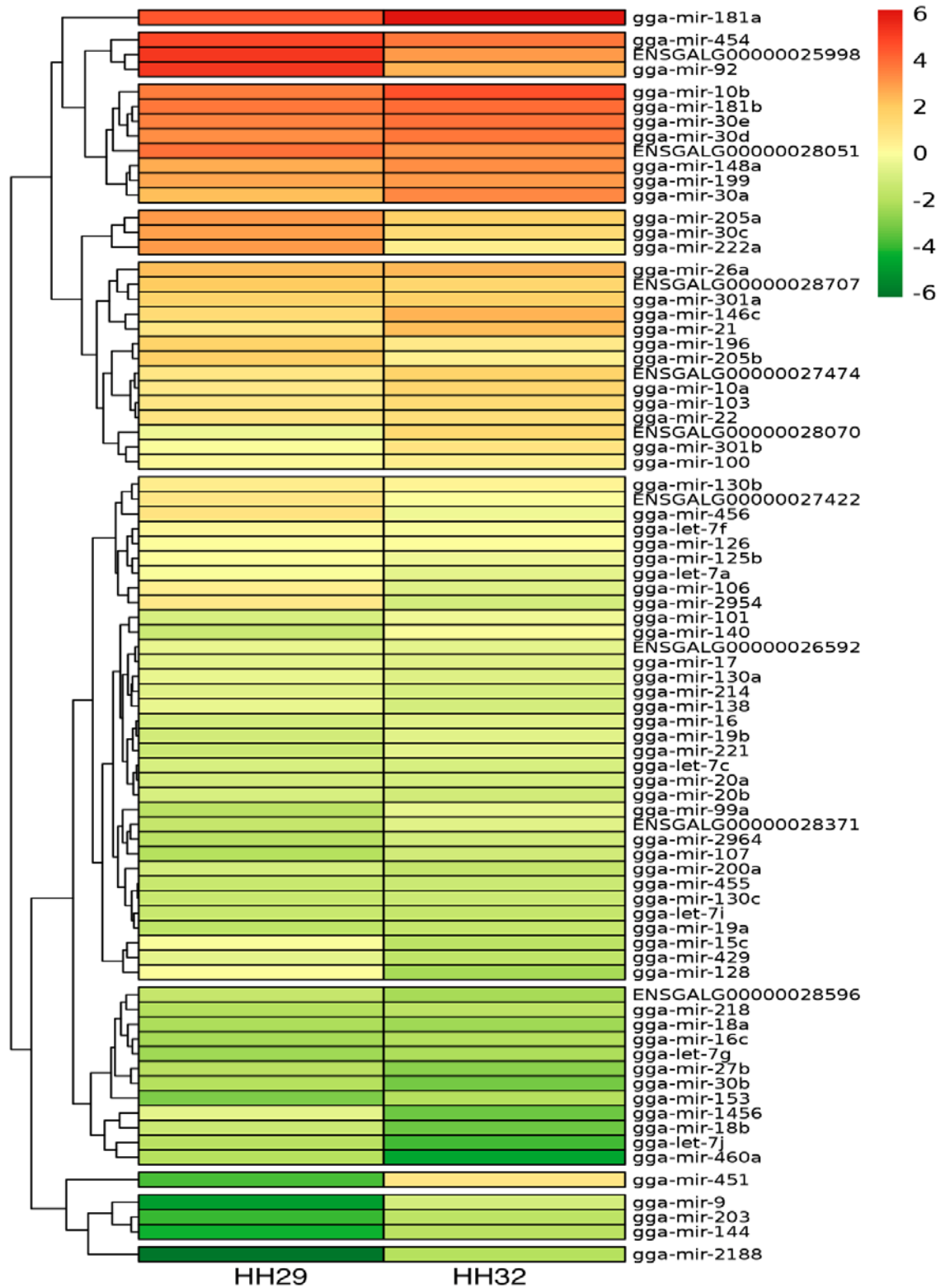


Figura 18: el dendrograma en el eje de la “Y” agrupa jerárquicamente los microRNA según su nivel de expresión y ratio de regulación entre los estadios 29HH y 32HH. La paleta de color refiere los niveles de regulación entre estadios de un microRNA concreto en una escala entre -6 (verde oscuro) y 6 (rojo oscuro).

2.1. MicroRNA altamente expresados en el interdígito

En las tablas 10 y 11 mostramos los microRNA con expresión elevada en el tejido del espacio interdigital, ordenados de acuerdo a su nivel de expresión en cada estadio. Los valores correspondientes al estadio 29HH se ilustran en la tabla 10 y los correspondientes al estadio 32HH en la tabla 11.

Los 71 microRNA presentes en las tablas —como se ha mencionado anteriormente— poseen valores ≥ 750 RPM en al menos uno de los dos estadios seleccionados.

Los valores referentes a las RPM reflejados en la tabla 10, corresponden al resultado de dos análisis independientes. Podemos apreciar un porcentaje de variación mínimo entre ambas muestras, en 35 de los microRNA no llega al 5%, mientras que otros 27 no alcanzan el 10%; la tasa de variación más elevada la presenta miR-144 con un rango de oscilación del 13,5%. Estos datos suponen un importante apoyo a la hora de validar el proceso de obtención y análisis de las muestras, ya que poseen un rango de variación asumible.

Los 10 primeros microRNA —como podemos ver indicado en las tablas 10 y 11— representan más del 50% del total del número de transcritos presentes en el mesodermo del espacio interdigital. Dos familias de microRNA, que se encuentran presentes entre estos 10 primeros microRNA, miR-181 y miR-30, muestran excepcionales niveles de expresión.

La familia de miR-181 está representada por sus formas maduras miR-181a y miR-181b abarcando más del 10% del total de las RPM de microRNA en el estadio 29HH y el 30% en el estadio 32HH. Las formas maduras miR-30a, miR-30b, miR-30c, miR-30d, y miR-30e de la familia miR-30 suponen más de un 10% del total de RPM en el estadio 32HH.

miR-92 es el microRNA con mayor número de RPM en el estadio 29HH sobrepasando el 10% del conjunto total; este microRNA pertenece al cluster miR-17-92 dentro del cual están incluidos miR-17, miR-18a, miR-18b, miR19a y miR19b (Du et al., 2015), expresados en el interdígito aunque a menor nivel. Dicho cluster puede no mostrar cambios al comparar estadios, como es el caso de miR-17,

miR-18a, miR19a, miR19b, o bien disminuir sus niveles de expresión, como en el caso de miR-92 y miR-18b.

Otros microRNA que exhiben elevados niveles de expresión en el interdígito son miR-454, miR-10b/miR-10a, miR-22a y miR-205a/miR205b.

2.1A. MicroRNA que aumentan su nivel de expresión durante el proceso de remodelación tisular

36 de los 71 microRNA conocidos que poseen más de 750 RPM, mostraron una expresión significativamente diferente entre los estadios 29 y 32HH.

20 microRNA incrementaron su expresión al menos 1,5 veces en el transcurso de la regresión del interdígito —como muestra la tabla 12—, incluyendo las familias de microRNA anteriormente mencionadas miR-181, miR-30 y miR-10 además de otros 16 microRNA.

Utilizando el programa bioinformático de predicción de rutas de interacción DIANA-miRPath v3.0 se hallaron seis rutas KEGG que podían ser potenciales dianas de los citados microRNA, como reflejan las tablas 13 y 14.

El incremento del índice de expresión más acusado lo muestra miR-451. Este microRNA ostenta bajos niveles de expresión en el estadio 29HH intensificándose 25.07 veces al alcanzar el estadio 32HH. Es interesante mencionar que miR-451 forma cluster y comparte propiedades funcionales con miR-144 (Pan et al., 2013), también sobre-expresado durante la muerte interdigital (5,12 veces), aunque en menor proporción.

miR-21 y miR-146c a pesar de poseer elevados niveles de expresión en el interdígito en estadios previos a la muerte, se incrementan de manera notable en el curso de la remodelación. miR-99a multiplica sus niveles de expresión 2,75 veces. miR-148a aumenta poco (1,56 veces) aunque su nivel de expresión en el tejido es elevado (más de 30.000 copias por millón).

miR-2188, con tan solo 47 copias por millón en el estadio 29HH, multiplica su expresión 18 veces alcanzando las 851 RPM en el estadio 32HH.

Existe otro bloque de microRNA que también incrementa su nivel de expresión durante la muerte aunque presenta bajo número de RPM en ambos estadios. Estos microRNA son: miR-9, miR-203, miR-140, miR-153, miR-301b, miR-107, miR-2964, miR-101 y miR-221. Es probable que este patrón de expresión esté producido por una minoría de linajes celulares presentes en los interdógitos.

2.1B. MicroRNA que disminuyen su expresión durante el proceso de remodelación tisular

Tal como muestra la tabla 15, 16 microRNA disminuyen su expresión durante el proceso de regresión del interdígito como mínimo 0,5 veces. Utilizando el programa bioinformático de predicción de rutas de interacción “DIANA-miRPath v3.0” se han hallado seis rutas KEGG que podían ser dianas potenciales de los citados microRNA (tablas accesorias 13 y 14).

Independientemente del análisis bioinformático anterior, la mitad de los microRNA que reducen su expresión, incluyendo miR-460a, miR-1456, miR-128, miR-18b, miR-let 7j y miR-15c muestran una mínima expresión en el tejido, por lo tanto es poco probable que funcionalmente desempeñen papeles relevantes durante la remodelación tisular.

Otros microRNA que disminuyen el nivel de expresión durante este proceso, aunque mantienen niveles notables de RPM, son: miR-222a, miR-205, miR-92, miR-454 y miR-30c; todos ellos son factores que —como clarificaremos en el apartado de discusión—, han sido relacionados en otros modelos con la muerte celular. Existe, también, un descenso notable en los niveles de expresión de miR-2954, miR-456, miR-429 y miR-106 entre los estadios 29HH y 32HH. Los niveles de expresión de estos microRNA se encuentran en rangos de entre 2000 y 6000 copias por millón, no obstante, su asociación con la muerte celular programada es en este caso difícil de determinar.

Orden 29HH	Nombre microARN	RPM 29HH	% cambio muestras				
1	gga-mir-92	127453,8	9	35	gga-mir-138	2563	8,5
2	gga-mir-454	97778,6	2,2	36	gga-mir-130a	2450,4	2,5
3	gga-mir-181a	79730,6	1,2	37	gga-mir-429	2390,1	6,5
4	gga-mir-181b	46060,8	3	38	gga-mir-17	2317,5	9,4
5	gga-mir-10b	44018,7	9,2	39	gga-mir-1456	2297,3	5,8
6	gga-mir-30e	39253,1	3,2	40	gga-mir-214	2106,7	8,6
7	gga-mir-30d	32357,5	4,5	41	gga-mir-20b	1817,3	6,6
8	gga-mir-222a	28509	2	42	gga-mir-101	1808,7	9,6
9	gga-mir-205a	27106,6	4,2	43	gga-let-7c	1780,8	12,3
10	gga-mir-30c	25854,5	1,4	44	gga-mir-200a	1697,3	6,8
11	gga-mir-199	23550,9	0,6	45	gga-mir-20a	1690,7	3,2
12	gga-mir-148a	22097,3	7,1	46	gga-mir-16	1587	7,2
13	gga-mir-30a	16980,6	4,4	47	gga-mir-19b	1545,2	12,5
14	gga-mir-26a	15983	10,7	48	gga-mir-18b	1446,4	1,3
15	gga-mir-205b	11626,6	0,8	49	gga-mir-140	1431,9	9,2
16	gga-mir-301a	10853	2,1	50	gga-mir-221	1356,3	8,9
17	gga-mir-196	10624,5	5,8	51	gga-mir-130c	1277,9	5,8
18	gga-mir-146c	8536,9	8,2	52	gga-mir-455	1253,9	1,7
19	gga-mir-456	6659,1	7,6	53	gga-let-7i	1253,4	4,1
20	gga-mir-22	6446,2	1,6	54	gga-mir-19a	1116,1	1,6
21	gga-mir-21	6183,1	12,2	55	gga-mir-2964	1017,6	2,5
22	gga-mir-103	6031,7	1,1	56	gga-mir-99a	960,4	12,5
23	gga-mir-2954	5706,8	2,1	57	gga-let-7j	909	12,8
24	gga-mir-10a	5608,1	11,4	58	gga-mir-27b	897,2	2,9
25	gga-mir-130b	5211,5	1,2	59	gga-mir-218	860,9	2,3
26	gga-mir-106	4572,3	0,4	60	gga-mir-460a	854,1	7
27	gga-let-7f	4042,7	5,9	61	gga-mir-107	821,5	0,8
28	gga-mir-100	3816,8	6,6	62	gga-mir-30b	795,2	5,5
29	gga-mir-125b	3508,6	3,7	63	gga-mir-18a	775,2	1,5
30	gga-mir-126	3461,8	5,9	64	gga-mir-16c	675,7	1,9
31	gga-mir-128	3432,4	9,1	65	gga-let-7g	616,7	1,1
32	gga-mir-301b	3386,3	0,1	66	gga-mir-153	420,4	3,1
33	gga-let-7a	3293,2	10,7	67	gga-mir-451	245,9	6,8
34	gga-mir-15c	3177,3	2,7	68	gga-mir-203	210,7	0,2
				69	gga-mir-144	175,8	13,5
				70	gga-mir-9	111,7	9,6
				71	gga-mir-2188	47,1	5,2

Tabla 10: muestra los 71 microRNA obtenidos, a partir de la secuenciación de los RNA de pequeño tamaño del tejido del interdígito, ordenados en relación a su nivel de expresión (RPM), en el estadio 29HH de desarrollo (día 6 posincubación).

Los valores de las RPM son el resultado de dos análisis independientes.

Los 71 microRNA presentes en la tabla, como se menciona en el texto, ostentan valores ≥ 750 RPM en al menos uno de los dos estadios seleccionados (ver también tabla 2).

Orden 32HH	Nombre microARN	RPM 32HH	% cambio 32HHvs29HH				
1	gga-mir-181a	254280	3,19	35	gga-mir-221	2376	1,75
2	gga-mir-10b	84990	1,93	36	gga-mir-16	2277	1,43
3	gga-mir-181b	58616	1,27	37	gga-mir-17	2258	0,97
4	gga-mir-30e	53041	1,35	38	gga-mir-106	2216	0,48
5	gga-mir-30d	47993	1,48	39	gga-mir-19b	2146	1,39
6	gga-mir-454	47705	0,49	40	gga-mir-130a	1974	0,81
7	gga-mir-30a	37389	2,2	41	gga-let-7c	1804	1,01
8	gga-mir-148a	34377	1,56	42	gga-mir-214	1792	0,85
9	gga-mir-199	27641	1,17	43	gga-let-20a	1779	1,05
10	gga-mir-146c	21193	2,48	44	gga-mir-2964	1750	1,72
11	gga-mir-92	20633	0,16	45	gga-mir-9	1727	15,46
12	gga-mir26a	18478	1,1	46	gga-mir-2954	1720	0,3
13	gga-mir-21	17356	2,81	47	gga-mir-138	1691	0,66
14	gga-mir-205a	11792	0,44	48	gga-mir-20b	1574	0,87
15	gga-mir-301a	11765	1,08	49	gga-mir-107	1519	1,85
16	gga-mir-10a	9965	1,78	50	gga-mir-455	1452	1,16
17	gga-mir-103	8820	1,46	51	gga-mir-130c	1412	1,11
18	gga-mir-30c	8360	0,32	52	gga-let-7i	1234	0,98
19	gga-mir-22	8130	1,26	53	gga-mir-200a	1220	0,72
20	gga-mir-301b	6882	2,03	54	gga-mir-19a	1183	1,06
21	gga-mir-451	6164	25,07	55	gga-mir-429	1078	0,45
22	gga-mir-196	5431	0,51	56	gga-mir-15c	1033	0,33
23	gga-mir-222a	5165	0,18	57	gga-mir-218	988	1,15
24	gga-mir-100	5056	1,32	58	gga-mir-203	971	4,61
25	gga-mir-205b	4680	0,40	59	gga-mir-144	900	5,12
26	gga-mir-130b	4465	0,86	60	gga-mir-16c	879	1,3
27	gga-mir-126	3590	1,04	61	gga-mir-2188	851	18,09
28	gga-let-7f	3465	0,86	62	gga-mir-153	832	1,98
29	gga-mir-140	3304	2,31	63	gga-let-7g	755	1,22
30	gga-mir-125b	2895	0,83	64	gga-mir-128	722	0,21
31	gga-mir-101	2736	1,51	65	gga-mir-18a	651	0,84
32	gga-mir-456	2725	0,41	66	gga-mir-27b	491	0,55
33	gga-mir-99a	2638	2,75	67	gga-mir-30b	407	0,51
34	gga-let-7a	2473	0,75	68	gga-mir-1456	353	0,15
				69	gga-mir-18b	347	0,24
				70	gga-let-7j	236	0,26
				71	gga-mir-460a	137	0,16

Tabla 11: muestra los 71 microRNA obtenidos, a partir de la secuenciación de los RNA de pequeño tamaño del tejido del interdígito, ordenados en relación a su nivel de expresión (copias por millón, RPM), en el estadio 32HH de desarrollo (día 7,5 posincubación).

Nombre microRNA	RPM 29HH	RPM 32HH	% cambio	Incremento expresión
gga-mir-451	245,87	6164,04	2406,98	25,07
gga-mir-2188	47,05	851,27	1709,2	18,09
gga-mir-9	111,66	1726,60	1446,35	15,46
gga-mir-144	175,82	900,43	412,12	5,12
gga-mir-203	210,66	971,45	361,14	4,61
gga-mir-181a	79730,62	254280,30	218,92	3,19
gga-mir-21	6183,10	17355,59	180,69	2,81
gga-mir-99a	960,39	2637,85	174,66	2,75
gga-mir-146c	8536,91	21193,16	148,25	2,48
gga-mir-140	1431,88	3303,67	130,72	2,31
gga-mir-30a	16980,62	37389,09	120,19	2,2
gga-mir-301b	3386,31	6881,89	103,23	2,03
gga-mir-153	420,35	831,93	97,91	1,98
gga-mir-10b	44018,66	84989,75	93,08	1,93
gga-mir-107	821,45	1518,71	84,88	1,85
gga-mir-10a	5608,09	9965,12	77,69	1,78
gga-mir-221	1356,32	2375,5	75,14	1,75
gga-mir-2964	1017,59	1750,2	71,99	1,72
gga-mir-148a	22097,28	34376,77	55,57	1,56
gga-mir-101	1808,72	2735,93	51,26	1,51

Tabla 12: muestra los 20 microRNA que incrementan sus niveles de expresión durante la regresión del interdígito, ordenados según su índice de regulación.

En la tabla podemos observar las copias (RPM) de cada microRNA según los estadios estudiados (29HH y 32HH), además del incremento del nivel de expresión descrito tanto en porcentaje como en múltiplo.

	Ruta KEGG	Valor p	Genes diana		MicroRNA
1	Biosíntesis de O-glicano tipo Mucina (gga00512)	2,98 e ^{-0,8}	<i>Galnt7;</i> <i>C1galt1;</i> <i>Galnt12</i>	<i>Galnt3;</i> <i>Galnt1;</i>	gga-miR-9; gga-miR-30a; gga-miR-181a; gga-miR-146c; gga-miR-148a; gga-miR-153;
2	Uniones adherentes (gga04520)	0,000904	<i>Csnk2a2;</i> <i>Snai1;</i> <i>Tcf712;</i> <i>Mllt4;</i> <i>Map3k7;</i> <i>Wasl;</i>	<i>Actn1;</i> <i>Ctnna1;</i> <i>Nlk;</i> <i>Actn2;</i> <i>Chalk5;</i> <i>Iqgap1;</i> <i>C-Met;</i> <i>Snai2</i>	gga-miR-181a; gga-miR-30a; gga-miR-153; gga-miR-10b; gga-miR-10a; gga-miR-203a; gga-miR-107; gga-miR-9-5p; gga-miR-2964
3	Transporte de ARN (gga03013)	0,015105	<i>Elac2;</i> <i>Gemin2;</i> <i>Upf3b;</i> <i>Eif4e;</i> <i>Nup210-201;</i> <i>Ncbp1;</i> <i>Ran;</i> <i>Xpo1;</i> <i>Fxr1;</i> <i>Nmd3;</i> <i>Nup153;</i> <i>Rpp40;</i> <i>Nup37;</i> <i>Strap;</i> <i>Ranbp2;</i> <i>Nupl1</i>	<i>Sumo2;</i> <i>Ube2i;</i>	gga-miR-30a; gga-miR-10b; gga-miR-10a; gga-miR-148a; gga-miR-181a; gga-miR-153; gga-miR-451; gga-miR-9; gga-miR-144; gga-miR-2964; gga-miR-203a; gga-miR-107; gga-miR-2188
4	Metabolismo de la cafeína (gga00232)	0,048757	<i>Xdh</i>		gga-miR-203a
5	Metabolismo de los ácidos grasos (gga01212)	0,048757	<i>Cpt1a;</i> <i>Ptp1b;</i> <i>Oxsm;</i> <i>Elovl5;</i> <i>Hadhb</i>		gga-miR-301b; gga-miR-181a; gga-miR-203a; gga-miR-30a; gga-miR-153
6	Proteólisis mediada por ubiquitina (gga04120)	0,048757	<i>Ube2i;</i> <i>Iap3;</i> <i>Cul4b;</i> <i>Fbxw7;</i> <i>Herc3;</i> <i>Itch;</i> <i>Ube2d3;</i> <i>Nedd4I;</i> <i>Trim37;</i> <i>Skp1;</i> <i>Cul3;</i> <i>Cul2;</i> <i>Nedd4;</i> <i>Bric6;</i> <i>Ube2j1;</i> <i>Ube2n;</i> <i>Ube2w;</i> <i>Ube3a;</i> <i>Cul5</i>		gga-miR-30a; gga-miR-10b; gga-miR-10a; gga-miR-148a; gga-miR-2964; gga-miR-181a; gga-miR-203a; gga-miR-107; gga-miR-153; gga-miR-21; gga-miR-101; gga-miR-140

Tabla 13. ruta KEGG.

	Ruta KEGG	Valor p	Genes diana		MicroRNA
1	Biosíntesis de O-glicano tipo Mucina (gga00512)	2,27 e ⁻¹⁴	<i>Thbs1</i> ; <i>Col4a6</i> ; <i>Col4a3</i> ; <i>Tnr</i> ; <i>Itga9</i> ; <i>Lama3</i> ; <i>Col4a1</i>	<i>Col4a5</i> ; <i>Col5a2</i> ; <i>Col1a2</i> ;	gga-let-7j ; gga-miR-205a ; gga-miR-106 ; gga-miR-15c ; gga-miR-18b ; gga-miR-205b ; gga-miR-1456
2	Uniones adherentes (gga04520)	0,001093	<i>Man1b1</i> ; <i>St6gal1</i> ; <i>Mgat4a</i> ; <i>St6gal2</i>	<i>Man2a1</i> ; <i>Man1a2</i> ;	gga-miR-106 ; gga-miR-30c ; gga-miR-18b ; gga-miR-92 ; gga-miR-2954 ;
3	Transporte de ARN (gga03013)	0,002942	<i>Galnt7</i> ; <i>Galnt1</i>	<i>Galnt3</i> ;	gga-miR-30c
4	Metabolismo de la cafeína (gga00232)	0,002942	<i>Ctk-1</i> ; <i>Snai1</i> ; <i>Nlk</i> ; <i>Ssx2ip</i> ; <i>Chalk5</i> ; <i>Map3k7</i> ; <i>Iqgap1</i> ; <i>Wasl</i>	<i>Csnk2a2</i> ; <i>Cdc42</i> ; <i>Ctnnb1</i> ; <i>Wasf1</i> ; <i>Ptpm</i> ;	gga-miR-18b ; gga-miR-30c ; gga-miR-15c ; gga-miR-106 ; gga-miR-92 ; gga-let-7j ; gga-miR-222a ; gga-miR-205a ; gga-miR-1456
5	Metabolismo de los ácidos grasos (gga01212)	0,013576	<i>Smaurf2</i> ; <i>Ube2i</i> ; <i>Cul4b</i> ; <i>Fbxw7</i> ; <i>Itch</i> ; <i>Ube2g1</i> ; <i>Nedd4l</i> ; <i>Trim37</i> ; <i>Fbxo4</i> ; <i>Cul2</i> ; <i>Nedd4</i> ; <i>Bric6</i> ; <i>Ube2e1</i> ; <i>Ube2j1</i> ; <i>Ube2n</i> ; <i>Ube2w</i> ; <i>Tceb1</i> ; <i>Herc2</i> ; <i>Cul5</i>	<i>Wwp2</i> ; <i>Fbxw7</i> ; <i>Nedd4l</i> ; <i>Cul2</i> ; <i>Bric6</i> ; <i>Ube2j1</i> ; <i>Ube2w</i> ;	gga-miR-460a ; gga-miR-92 ; gga-miR-106 ; gga-miR-30c ; gga-miR-1456 ; gga-miR-15c ; gga-miR-456 ; gga-miR-454 ; gga-miR-205b ; gga-miR-205a
6	Proteólisis mediada por ubiquitina (gga04120)	0,016154	<i>Smurf2</i> ; <i>Smad7a</i> ; <i>Fst</i> ; <i>Bambi</i> ; <i>Chalk5</i> ; <i>Smad6</i> ; <i>Gamma</i> ; <i>E2f5</i> ; <i>Tfdp1</i>	<i>Thbs1</i> ; <i>BmpR-II</i> ; <i>Zfyve9</i> ; <i>Ifn</i> ;	gga-miR-15c ; gga-miR-205a ; gga-miR-106 ; gga-miR-30c ; gga-miR-1456 ; gga-miR-92 ; gga-miR-18b ; gga-let-7j

Tabla 14. ruta KEGG.

Nombre microRNA	RPM 29HH	RPM 32HH	% cambio	Incremento expresión
gga-mir-1456	2297,34	352,83	-84,64	0,15
gga-mir-460a	854,05	137,33	-83,92	0,16
gga-mir-92	127453,83	20633,25	-83,81	0,16
gga-mir-222a	28508,99	5164,61	-81,88	0,18
gga-mir-128	3432,42	722,34	-78,96	0,21
gga-mir-18b	1446,38	347,19	-76	0,24
gga-let-7j	909,01	235,98	-74,04	0,26
gga-mir-2954	5706,82	1720,16	-69,86	0,3
gga-mir-30c	25854,48	8360,42	-67,66	0,32
gga-mir-15c	3177,28	1032,92	-67,49	0,33
gga-mir-205b	11626,6	4680,44	-59,74	0,4
gga-mir-456	6659,1	2724,88	-59,08	0,41
gga-mir-205a	27106,55	11792,22	-56,5	0,44
gga-mir-429	2390,11	1078,05	-54,9	0,45
gga-mir-106	4572,27	2216,42	-51,52	0,48
gga-mir-454	97778,63	47705,19	-51,21	0,49

Tabla 15: muestra los 16 microRNA que reducen sus niveles de expresión durante la regresión del interdígito, ordenados según su índice de regulación.

En la tabla podemos observar las copias (RPM) de cada microRNA según los estadios estudiados (29HH, 32HH) además del descenso en los niveles de expresión, expresados tanto en porcentaje como en múltiplo.

2.2. Análisis de las secuencias no caracterizadas

9 secuencias no caracterizadas de posibles microRNA (tabla 16), previamente incluídas en la base de datos ENSEMBL v. 74 genome assembly Galgal 4, muestran, en el interdígito, más de 750 copias por millón. Dos de estas secuencias (ENSGALG00000028371 y ENSGALG00000026492) no tienen relación con los microRNA conocidos. Las otras 7, aunque aún no han sido clasificadas, están secuencial y estructuralmente relacionadas con miR-143 (ENSGALG00000028070), miR182 (ENSGALG00000027474), miR-19 (ENSGALG00000028596); miR-363 (ENSGALG00000028707), miR-26 (ENSGALG00000028051), mir-10 (ENSGALG00000027422), y miR-25 (ENSGALG00000025998). Merece la pena destacar, que la expresión de la secuencia homóloga a miR-143 aumenta su nivel de expresión durante el curso de la regresión de manera notable. Este microRNA, en otras líneas celulares, tiene como diana génica *Bcl2*, implicado en la apoptosis (Liu Et al., 2012).

De forma similar, la expresión de la secuencia homóloga de miR-25 disminuye drásticamente durante el curso de la regresión. miR-25 en otros sistemas celulares protege frente al estrés oxidativo e inhibe la apoptosis (Li et al., 2014; Pan et al., 2015).

Secuencia ENSEMBL	RPM 29HH	% cambio	RPM 32HH	I.E.	Posible microARN
ENSGAL00000028070	2684	-1,4	9648	3,59	mir-143
ENSGAL00000028371	1135,1	-23,3	2141	1,89	xxx
ENSGAL00000027474	6184	1,2	10759	1,74	mir-182
ENSGAL00000026592	2434,2	-26,3	2460	1,01	xxx
ENSGAL00000028707	14070,3	4,1	10228	0,73	mir-363
ENSGAL00000028051	49509,3	0,3	32094	0,65	mir-26
ENSGAL00000028596	1166,5	-17,8	744	0,64	mir-19
ENSGAL00000027422	5991,9	14,1	3779	0,63	mir-10
ENSGAL00000025998	124907,8	6,8	28898	0,23	mir-25

Tabla 16: muestra las secuencias de microRNA no identificadas que se expresan por encima de 750 RPM.

En la segunda y cuarta columna se indican los valores de las RPM en los estadios 29HH (media de las dos muestras secuenciadas en este estadio) y 32HH. La tercera muestra la diferencia en porcentaje que existe entre las dos muestras secuenciadas en el mismo estadio 29HH. La quinta, el cambio de expresión que se produce en el estadio 32HH con respecto al 29HH (momento de la muerte y antes de ella) expresados en múltiplo. La sexta, microRNA al que posiblemente pertenezca la secuencia sin identificar.

2.3. Validación de la secuenciación de RNA

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación masiva de RNA se han corroborado mediante análisis complementarios por qPCR de 7 microRNA. Estos microRNA han sido seleccionados entre los que incrementan y los que disminuyen su nivel de expresión —según los datos de la secuenciación masiva—, validando tanto las cadenas -3p (3') como las -5p (5').

La figura 19 muestra las medidas adquiridas por qPCR que confirman tanto el aumento de los niveles de expresión durante la remodelación del interdígito de miR-451-5p (figura 19A), miR-144-5p (figura 19B), miR-21-5p (figura 19C), mir-30a-5p (figura 19D), miR-146c-5p (figura 19E) y mir-181a-5p (figura 19G), como la disminución de la expresión de miR-92-3p (figura 19F).

En el caso de miR-181a, hay que resaltar el hecho de que tanto miR-181a-5p (figura 19G), como miR181a-3p (figura 19H), mostraron un aumento de su expresión durante el proceso de muerte celular. Al comparar los niveles de expresión de la cadena -3p de miR-181a con respecto a la cadena -5p de miR-181a (figura 19I), encontramos que los niveles de miR-181a-5p eran mayores. Puestos en conjunto, estos datos confirman los resultados anteriores. Podemos observar también, de forma consecuente a lo observado en otros modelos tisulares, que las cadenas 3' de estos microRNA son casi indetectables, excepto en los casos de miR-181a y miR-92, sugiriendo una rápida degradación.

Hemos podido comprobar, en el caso de miR-92, que la expresión de su cadena 5' en el interdígito, de forma contraria a lo ocurrido con los otros microRNA, es 10^{-3} veces más baja que la de su cadena 3'.

La cadena 3' de miR-181a (también conocida como miR-213) se encuentra fuertemente expresada en el interdígito (Figura 18 y tablas 10 y 11) y sus RPM aumentan durante el transcurso de la regresión tisular. Este microRNA pertenece a un grupo de microRNA que coordina mecanismos moleculares como respuesta al estrés ambiental, conocido con el nombre de miRStress (Jacobs et al., 2013).

Otros microRNA presentes en la base de datos de miRStress que se expresan durante esta fase son: miR-181b, miR-21 y miR-106 (Jacobs et al., 2013); sin embargo, excepto miR-21, los otros microRNA o disminuyen su nivel de expresión o su incremento no es muy notable (miR-181b y miR-106), en comparación con otros microRNA

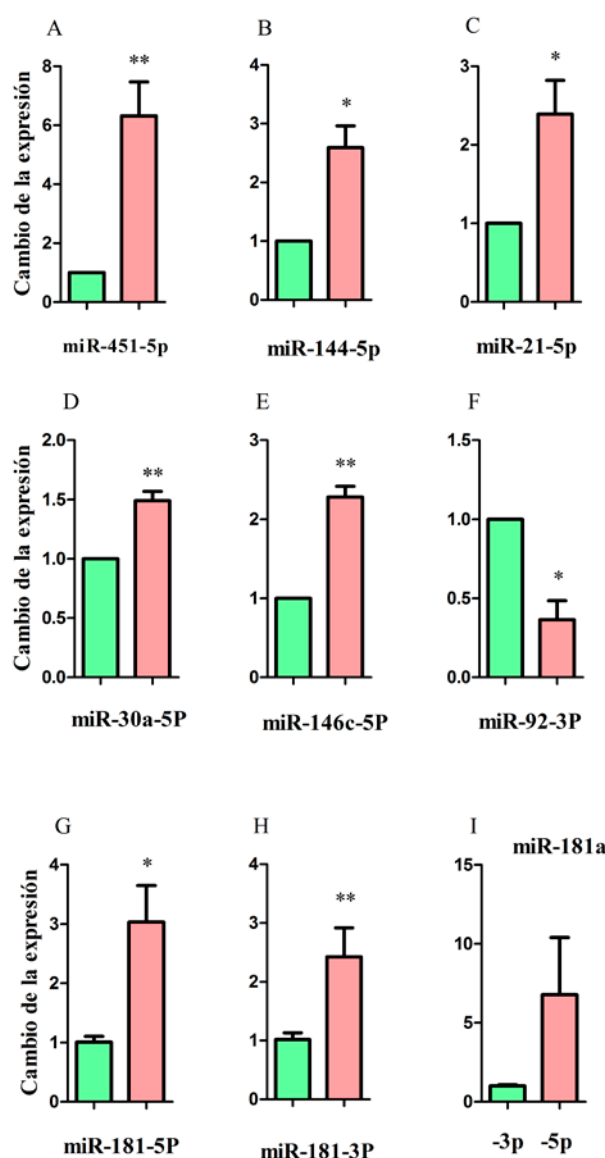


Figura 19: (A-I) muestra el análisis del nivel de expresión por qPCR de miR-451, miR-144, miR-21, miR-30a, miR146c, miR-92 y miR-181a.

(A-E) Los datos confirman el aumento de la expresión de miR-451 (A), miR-144 (B), miR-21(C), miR-30a (D), miR-146c (E) y miR-181a (G-H) en el estadio 32HH (columnas rojas de la derecha), al compararlo con los niveles de expresión del estadio 29HH (columnas verdes de la izquierda).

En el caso de miR-181a, ambas cadenas (miR-181a-5p y miR-181a-3p) exhiben una expresión elevada en el tejido del interdígito además de aumentar sus niveles de expresión durante el transcurso de la regresión tisular. En la gráfica (I) se muestra la comparación de los niveles de expresión de ambas cadenas de miR-181a en el estadio 32HH. (F) Los resultados obtenidos mediante qPCR, confirman la disminución de la expresión de miR-92 en el estadio 32HH (columna roja de la derecha) con respecto al estadio 29HH (columna verde de la izquierda).

2.3A. Diferencias dígito-interdígito en la regulación de la expresión de microRNA

Para descartar que las diferencias en los niveles de expresión, de los microRNA seleccionados, que aumentan su nivel de expresión en el transcurso de la remodelación tisular, son debidas a la maduración del tejido y no a consecuencia del proceso degenerativo, se han analizado por qPCR posibles cambios de expresión en los radios digitales (figura 20).

De esta forma hemos podido observar que, al comparar los niveles de expresión en los dedos del estadio 32HH con el estadio 29HH, no se producen cambios significativos en ninguno de los microRNA seleccionados (figura 20). No obstante, sí pudimos apreciar un ligero aumento de la expresión en miR-181a, miR-451 y miR-144. A pesar de ello, no debe descartarse su implicación en el proceso de regresión tisular, ya que, del mismo modo que sucede en los otros microRNA, sus niveles de expresión en los radios digitales son más bajos que en los interdígitos (figura 20). Únicamente como excepción, respecto a los demás microRNA analizados por qPCR, mencionar que miR-146c muestra un nivel de expresión similar tanto en los radios digitales, como en el tejido del espacio interdigital en el estadio 32HH. Por lo tanto, en este caso, no puede descartarse que la función de este microRNA responda a funciones diferentes de la regresión interdigital.

El análisis de miR-92-3p, en los radios digitales, no aportó datos concluyentes sobre su potencial implicación en el proceso regresivo, ya que, aunque su expresión en el radio digital en el estadio 32HH es superior a la del interdígito, se expresa a niveles bajos en los radios digitales, tanto en el estadio 32HH, como en el 29HH (figura 20 y 21).

Figura 20: muestra los cambios de expresión, de los microRNA, al comparar los dedos del estadio 29HH con los del 32HH. Como podemos observar, no se producen cambios significativos. La línea de puntos muestra el nivel de expresión del microRNA correspondiente en el estadio 29HH, mientras que las barras lo hacen para el estadio 32HH.

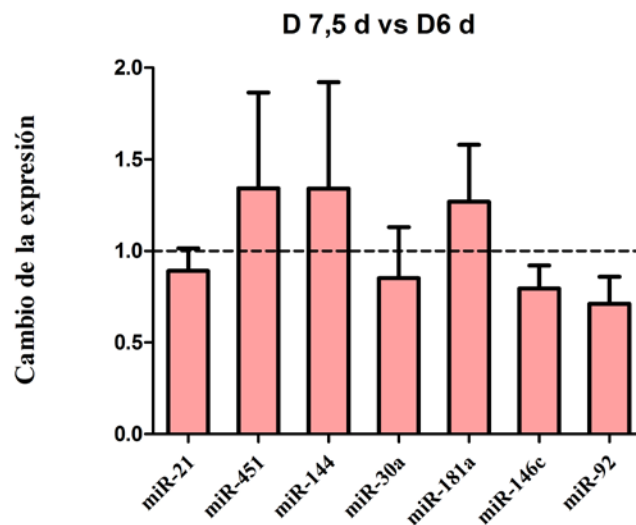
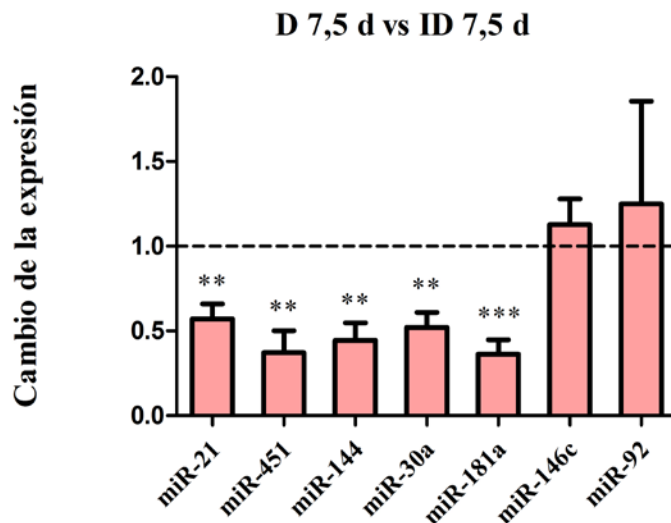


Figura 21: muestra los cambios de expresión al comparar los niveles de los microRNA, seleccionados para validar la secuenciación, en dedos e interdógitos en el estadio 32HH.

Así pues, podemos observar que miR-21, miR-451, miR-144, miR-30a disminuyen de forma muy significativa ($p \leq 0,01$), siendo miR-181a el que disminuye de forma más acusada ($p \leq 0,001$). De forma contraria a lo que ocurre con todos estos microRNA, que aumentan su expresión en el interdígito, miR-146c no muestra cambios significativos. Podemos ver también que miR-92, seleccionado por disminuir su expresión durante el proceso de regresión tisular, aumenta ligeramente su expresión. La línea de puntos muestra el nivel de expresión del microRNA correspondiente en el estadio 29HH, mientras que las barras lo hacen para el estadio 32HH.



2.3B. Regulación de la expresión de microRNA en las membranas interdigitales del pato

Con el fin de establecer una relación más estrecha entre la regulación de la expresión de microRNA y la degeneración del tejido interdigital, hemos analizado por qPCR la evolución de la expresión de los microRNA seleccionados que aumentan su nivel de expresión en el transcurso de la remodelación tisular en el pollo, en el tercer interdígito de la pata de embriones de pato.

Como paso previo, se ha tratado de caracterizar el proceso degenerativo presente en el tejido del tercer espacio interdigital del pato. Tal como podemos observar en la figura 22, entre los días 7,5 y 8 PI, el autopodio de pato muestra los radios digitales de todos los dedos separados por los espacios interdigitales correspondientes. Estos últimos, carecen de células degeneradas, detectables mediante tinción vital con rojo neutro (periodo pre-apoptótico; figura 22A). Entre los días $10\frac{1}{2}$ y $10\frac{3}{4}$ la muerte interdigital adquiere máxima intensidad en la tercera membrana interdigital (periodo apoptótico; figura 22B y 22C). En ella se distingue una región distal, en la que la muerte es masiva, y una región proximal, donde la muerte es abundante aunque no tan intensa como ocurre en el embrión de pollo. Esta zona, donde podemos apreciar muerte masiva (figura 22B*), esculpe la punta de los dedos, eliminando el tejido interdigital situado entre las falanges distales de los dedos 3 y 4. A partir del día 11 de desarrollo, la membrana interdigital adquiere su morfología final y carece de células muertas (periodo posapoptótico; figura 22D).

En base a la secuencia degenerativa descrita, en nuestro estudio seleccionamos la membrana interdigital presente en los días 7,5 y 8 para establecer el patrón de expresión de microRNA antes del proceso degenerativo. La membrana interdigital de patos comprendidos entre los estadios de $10\frac{1}{2}$ y $10\frac{3}{4}$ se seleccionó como periodo de máxima muerte interdigital. Finalmente, la membrana interdigital de embriones de pato, comprendidos entre los días 11 y $11\frac{1}{2}$ de incubación se eligió para establecer el patrón de expresión una vez pasado el periodo degenerativo.

Tal como representan las gráficas de la figura 23, los niveles de expresión de miR-21, miR-181a, y miR-30a durante el transcurso de los estadios, muestran una secuencia en su regulación consistente con una implicación positiva de estos microRNA en el proceso degenerativo. miR-451 incrementa significativamente ($p \leq 0,05$) su expresión en el periodo de degeneración, y transcurrido este, sus niveles de expresión caen, aunque estos se mantienen relativamente altos. La expresión de miR-144 disminuye significativamente ($p \leq 0,05$) una vez pasado el proceso degenerativo, pero su expresión no se incrementa en el periodo de máxima degeneración.

De la misma forma que ocurre con la ausencia de regulación diferencial entre dedos e interdógitos apreciado en las patas de pollo los niveles de expresión de miR-146c no parecen correlacionarse con el proceso degenerativo, ya que, aunque su expresión se incrementa de forma muy significativa ($p \leq 0,001$) en el periodo apoptótico, en la fase posapoptótica no se aprecia la disminución de su nivel de expresión.

La expresión de miR-92 sufre una disminución muy significativa ($p \leq 0,01$) en sus niveles de expresión durante el proceso de remodelación tisular, y sus niveles de expresión siguen disminuyendo de la misma manera una vez concluido el proceso degenerativo.

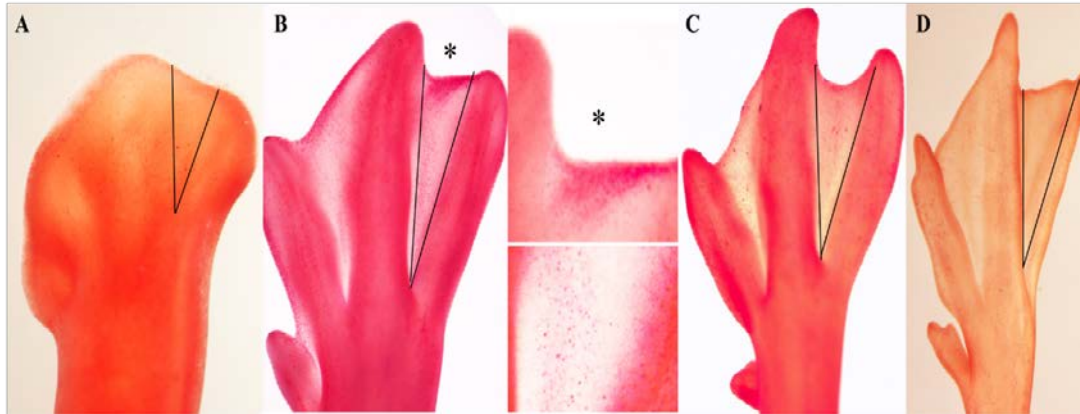


Figura 22: muestra autopodios de embriones de pato (*Anas platyrhynchos*) a diferentes días PI, teñidos con rojo neutro.

- A. *Estadio pre-apoptótico (7,5-8 días PI) del autopodio de embrión de pato. No se observa tinción positiva (muerte celular) en el interdígito (área comprendida entre las líneas negras).*
- B. *Estadio apoptótico (10'5 10'75 días PI) del autopodio de embrión de pato. Se puede apreciar un marcaje rojo intenso granulado, propio de la tinción positiva, de las células apoptóticas, dentro del área delimitada.
(*) Aumento de la zona positiva a la tinción de la imagen B para poder apreciar con más detalle el área donde se produce la muerte celular.*
- C. *Final del estadio apoptótico (11 días PI) del autopodio de embrión de pato. Aún podemos observar, dentro del área delimitada, marcaje positivo, además de ser evidente el efecto modelador que ha producido la muerte celular.*
- D. *Estadio posapoptótico (11,5 días PI) del autopodio de embrión de pato. El autopodio ha finalizado su proceso de remodelación.*

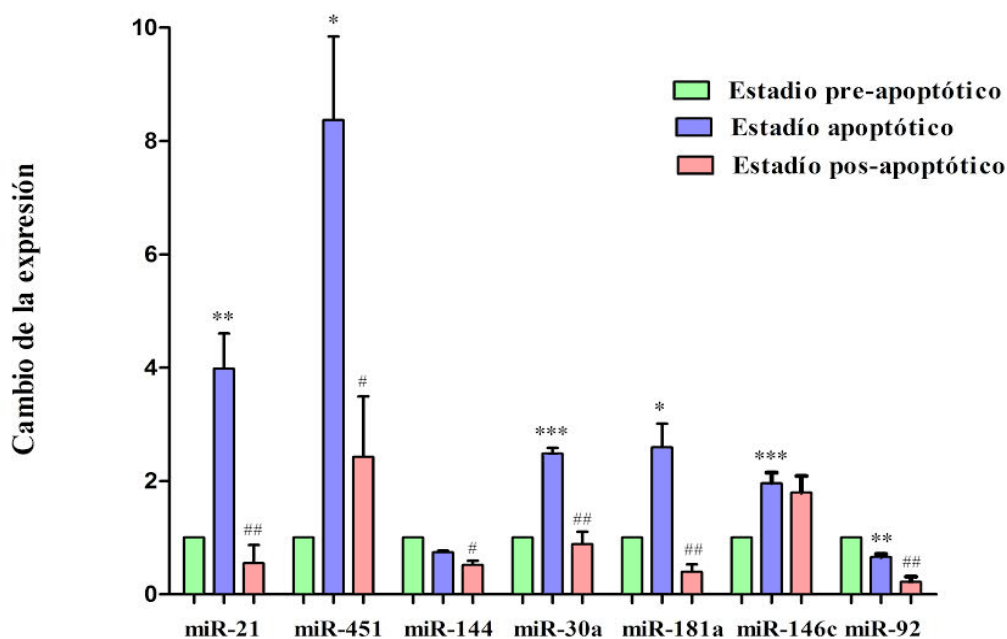


Figura 23: muestra los niveles de expresión, de los microRNA seleccionados, en el pato (*Anas platyrhynchos*) en los estadios pre-apoptótico, apoptótico y posapoptótico.

Como podemos apreciar, miR-21 aumenta muy significativamente ($p \leq 0,01$) al comparar el estadio apoptótico en relación al pre-apoptótico (*), y cae de la misma manera al comparar el estadio posapoptótico con el apoptótico (#).

miR-451 aumenta significativamente ($p \leq 0,05$) al comparar el estadio apoptótico en relación al pre-apoptótico (*), y cae de la misma manera al comparar el estadio pos-apoptótico con el apoptótico (#).

miR-144 no muestra cambios significativos al comparar el estadio apoptótico en relación al pre-apoptótico (*), y cae significativamente ($p \leq 0,05$) al comparar el estadio posapoptótico con el apoptótico (#).

miR-30a aumenta muy significativamente ($p \leq 0,001$) al comparar el estadio apoptótico en relación al pre-apoptótico (*), y cae muy significativamente ($p \leq 0,01$) al comparar el estadio posapoptótico con el apoptótico (#).

miR-181a aumenta significativamente ($p \leq 0,05$) al comparar el estadio apoptótico en relación al pre-apoptótico (*), y cae muy significativamente ($p \leq 0,01$) al comparar el estadio posapoptótico con el apoptótico (#).

miR-146c aumenta muy significativamente ($p \leq 0,001$) al comparar el estadio apoptótico en relación al pre-apoptótico (*), aunque no muestra cambios significativos al comparar el estadio posapoptótico con el apoptótico (#).

miR-92 cae muy significativamente ($p \leq 0,01$) en ambas comparaciones(*)(#).

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE miR-451 Y DE miR-21

Se han seleccionado dos microRNA, miR-451 y miR-21, con elevada expresión en el tejido y regulados positivamente en el transcurso de la remodelación tisular, con el objetivo de dar soporte funcional a nuestras observaciones.

Este apartado del estudio se ha abordado desde tres enfoques diferentes: en primer lugar, se ha realizado un análisis por citometría de flujo para determinar —a partir de la electroporación de las células con los pre-miR de ambos microRNA—, el patrón de ciclo celular y la intensidad de la muerte celular en células interdigitales disociadas en cultivos de 24 y 48 horas en condiciones de baja densidad (monocapa; figura 24).

En segundo lugar, a las 48 horas de cultivo, se ha determinado, en cultivos realizados según la misma técnica, el patrón de regulación de un panel de genes (figuras 25 y 26) involucrados en las siguientes funciones: diferenciación de los progenitores esqueléticos (*Sox9*, *Col2a*, y *Scleraxis*); regulación de la muerte celular (*Bcl-2* y *Bak*); elementos del SASP (del inglés senescence-associated secretory phenotype) incluyendo, factores de crecimiento con un papel funcional en el destino de los progenitores del esbozo de extremidad (IGF-1; TGF β 2; GDF5; FGF10; BMP2; BMP7; Lorda-Diez et al., 2015a) y genes supresores tumorales involucrados en la regresión del interdígito (*Btg1* y *Btg2*; Lorda-Diez et al., 2016).

La sobre-expresión del microRNA —de todas las muestras analizadas—, se ha confirmado por qPCR y los valores se han comparado con las células electroporadas con el control negativo (HMC0002; Sigma). Seleccionamos, únicamente, las muestras en las que la sobre-expresión del microRNA ha sido ≥ 100 veces. El propósito de esta selección ha sido la de determinar los patrones de regulación génica de ambos microRNA (figuras 25 y 26). En el caso de miR-21 estos experimentos se han complementado con una aproximación de pérdida de función transfectando LNA-anti-miR-21 (figura 27).

Finalmente, en un intento por averiguar las rutas moleculares a las que podrían estar asociados funcionalmente los microRNA elegidos, realizamos un análisis transcriptómico de los cultivos tras diferentes tratamientos con factores de los que conocemos su implicación en la remodelación del interdígito. Los factores incluidos

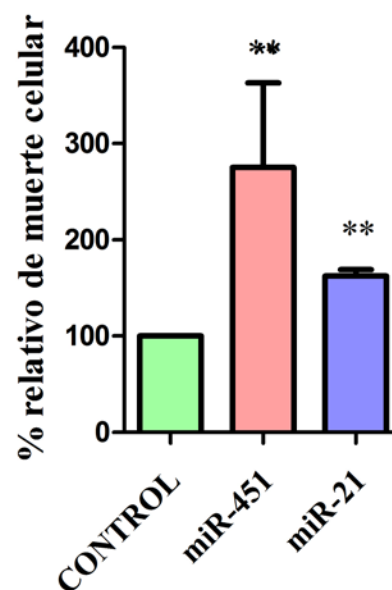
son: H_2O_2 para incrementar el estrés oxidativo; BMP2 y *Noggin* como reguladores de la muerte y diferenciación a cartílago; TGF β 3 como modulador de la señal de BMP (Montero et al., 2008) y FGF2, como señal característica y necesaria para mantener a las células indiferenciadas y proliferantes (figura 28 y 29).

3.1. Análisis por citometría de flujo

Se ha observado —al realizar varios análisis por citometría de flujo—, que no existen cambios significativos en el patrón del ciclo celular tras la electroporación de pre-miR-451 ni pre-miR-21, mientras que la intensidad de muerte celular, detectada mediante este procedimiento, muestra un incremento medio del 275% 48 horas después de la electroporación de pre-miR-451 y un incremento medio del 163% 48 horas tras la electroporación de pre-miR-21 (Figura 24).

Figura 24: ilustra el incremento de muerte en las células mesenquimales de la extremidad del embrión de pollo en cultivos de 48h.

Los resultados se han obtenido a través de análisis por citometría de flujo de las células electroporadas con un control negativo (columna verde de la izquierda), premiR-451 (columna roja central) y premiR-21 (columna azul de la derecha).



3.2. Patrón de regulación génica de los microRNA seleccionados

En el caso de la sobre-expresión de miR-451 —como se observa en la figura 25—, cabe destacar una caída moderada de *Sox9*, un factor de transcripción fundamental en la condrogénesis y cuyo silenciamiento promueve la apoptosis en los progenitores esqueléticos (Akiyama et al., 2002). Igualmente destaca el incremento de IGF1 que es un marcador tentativo del SASP (Lorda-Diez et al., 2015a; Lorda-Diez et al., 2015b). Otras regulaciones parecen menos relevantes, como por ejemplo *Col2a1*, que aparece regulado negativamente, hecho que concuerda con la caída de *Sox9*. Otro factor regulado negativamente fue *Tgfβ2*.

El análisis transcriptómico tras sobre-expresar miR-21 —como se ve reflejado en la figura 26—, muestra una caída significativa de *Bcl2*, un gen inhibidor de la apoptosis que se regula negativamente durante la regresión del tejido en el espacio interdigital presente en la etapa embrionaria (Novack and Korsmeyer, 1994), igualmente, *Sox9* y *TGFβ2* aparecen regulados negativamente. Como se ha especificado anteriormente, *Sox9* es imprescindible para la supervivencia de los progenitores esqueléticos (Akiyama et al., 2002), mientras que *TGFβ2* juega un papel importante en el desarrollo de los dedos y su aplicación en el interdígito inhibe inicialmente la muerte celular promoviendo —en periodos más largos—, la formación de un dedo ectópico (Ganan et al., 1996). Al igual que con miR-451, IGF-1 apareció intensamente sobre-expresado.

El efecto negativo sobre los genes a consecuencia de la sobre-expresión de miR-21, en relación con la expresión de *Bcl2*, *Sox9* y *Tgfβ2* ha tratado de confirmarse a partir de experimentos de pérdida de función. Con este propósito, se han electroporado los progenitores con LNA-anti-miR-21, obteniendo una reducción de 0.3x en la expresión de miR-21 respecto a los controles electroporados con la construcción control “mismatch-inhibitor”. En los cuatro experimentos realizados, *Bcl2* aparece moderadamente elevado, alcanzando una media de 1,37x. De igual modo, *Sox9* alcanza niveles medios de 2,29x y *Tgfβ2* que alcanza niveles medios de expresión de 2,51x, tal como ilustra la figura 27.

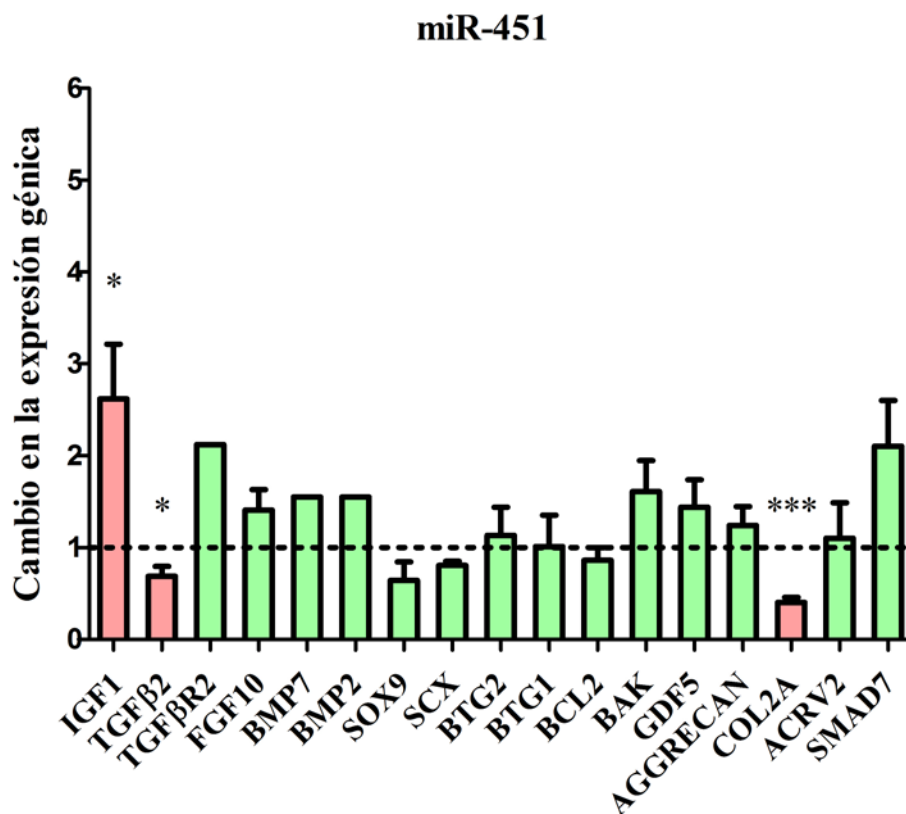


Figura 25: muestra el comportamiento mostrado por los diferentes genes testados al sobre-expresar miR-451 a partir de la electroporación, en las células mesenquimales del autopodio del embrión de pollo, de Pre-miR-451.

En color rojo podemos observar las regulaciones génicas más significativas producidas al sobre-expresar miR-451. Podemos comprobar, como aumenta significativamente la expresión de IGF1 ($p < 0,05$) y disminuye de forma muy significativa Col2a ($p < 0,001$) en relación con los cultivos control (línea discontinua).

En color verde están representadas las regulaciones que no obtuvieron significación estadística al sobre-expresar miR-451, en relación con los cultivos control.

El nivel de expresión de cada gen en los cultivos electroporados con el control negativo, se ha utilizado como calibrador (línea discontinua).

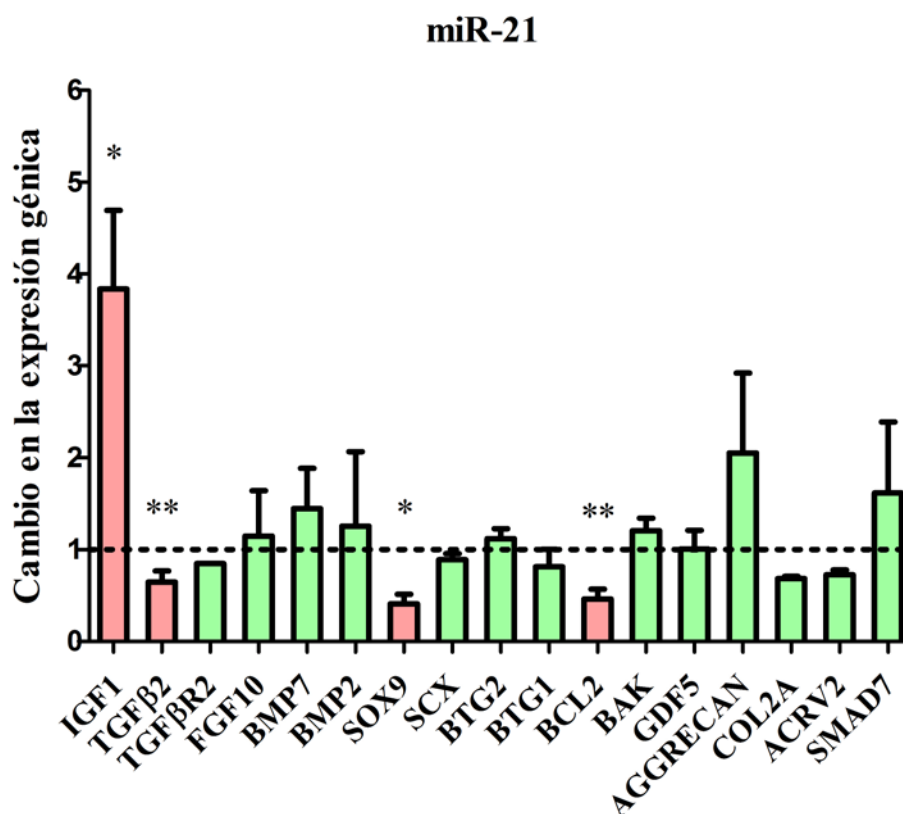


Figura 26: muestra el comportamiento mostrado por los diferentes genes testados al sobre-expresar miR-21 a partir de la electroporación, en las células mesenquimales del autopodio del embrión de pollo, de Pre-miR-21.

En color rojo podemos observar las regulaciones génicas más significativas producidas al sobre-expresar miR-21. Podemos comprobar, como aumenta, de forma significativa, la expresión de IGF1 ($p < 0,05$) y disminuye de forma muy significativa la expresión de TGFβ2 ($p < 0,01$), significativa Sox9 ($p < 0,05$) y muy significativa Bcl2 ($p < 0,01$), en relación con los cultivos control (línea discontinua).

En color verde están representadas las regulaciones que no obtuvieron significación estadística al sobre-expresar miR-451, en relación con los cultivos control.

El nivel de expresión de cada gen en los cultivos electroporados con el control negativo, se ha utilizado como calibrador (línea discontinua).

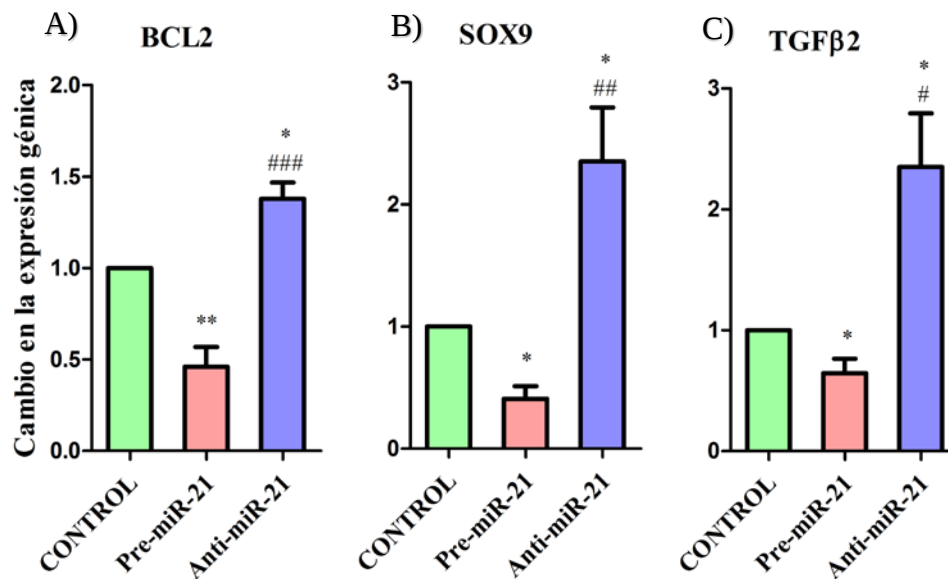


Figura 27: muestra la confirmación del efecto negativo, que ha producido la sobre-expresión de miR-21, en los genes Bcl2, Sox9 y Tgfβ2. Dicha confirmación se ha obtenido a partir de experimentos de pérdida de función realizados con progenitores celulares electroporados con LNA-anti-miR-21.

La gráfica A muestra los cambios en la expresión génica de Bcl2, comparando los resultados de ganancia de función de miR-21 (explicados anteriormente) con los de pérdida de función de este mismo microRNA. Las células electroporadas con el anti-miR LNA-anti-miR-21 (barra azul), que han reducido la expresión de miR-21, muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) del nivel de expresión del gen Bcl2 respecto al cultivo control (barra verde, utilizado como calibrador) y un aumento muy significativo ($p < 0,001$) respecto a las células que han sobre-expresado miR-21.

La gráfica B muestra los cambios en la expresión génica del gen Sox9, comparando los resultados de ganancia de función de miR-21 (explicados anteriormente) con los de pérdida de función de este mismo microRNA. Las células electroporadas con el anti-miR LNA-anti-miR-21 (barra azul), que han reducido la expresión de miR-21, muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) del nivel de expresión del gen Sox9 respecto al cultivo control (barra verde, utilizado como calibrador) y un aumento muy significativo ($p < 0,01$) respecto a las células que han sobre-expresado miR-21.

La gráfica C muestra los cambios en la expresión génica del gen TGFβ2, comparando los resultados de ganancia de función de miR-21 (explicados anteriormente) con los de pérdida de función de este mismo microRNA. Las células electroporadas con el anti-miR LNA-anti-miR-21 (barra azul), que han reducido la expresión de miR-21, muestran aumentos significativos ($p < 0,05$) del nivel de expresión del gen TGFβ2 respecto al cultivo control (barra verde, utilizado como calibrador) y a las células que han sobre-expresado miR-21.

3.3. Regulación de miR-21 y miR-451 en los cultivos celulares tras diferentes tratamientos

Como mostramos en las figuras 28 y 29, en lo referente a la regulación de la expresión de miR-451 y de miR-21 tras diferentes tratamientos en cultivos celulares, hemos podido observar que ambos aumentan su expresión en cultivos tratados con H₂O₂ a una concentración de 0.4 µM. Este resultado concuerda con la implicación de miR-21 en procesos de inflamación y estrés oxidativo.

Los tratamientos con BMP2 no han modificado significativamente ninguno de los dos microRNA; sin embargo *Noggin* muestra un efecto positivo sobre la expresión de miR-451, lo que podría sugerir que otro de los BMPs expresados en el interdígito fuese más eficiente estimulando la señalización por Smad1/5/8.

Los tratamientos con TGFβ3 causaron una intensa regulación de miR-21 y moderada de miR-451.

Finalmente FGF2 dio lugar a la regulación positiva de miR-21 pero no de miR-451 y de forma similar sucedió con SIS3, aunque la regulación positiva de miR-21 no resultó ser significativa estadísticamente.

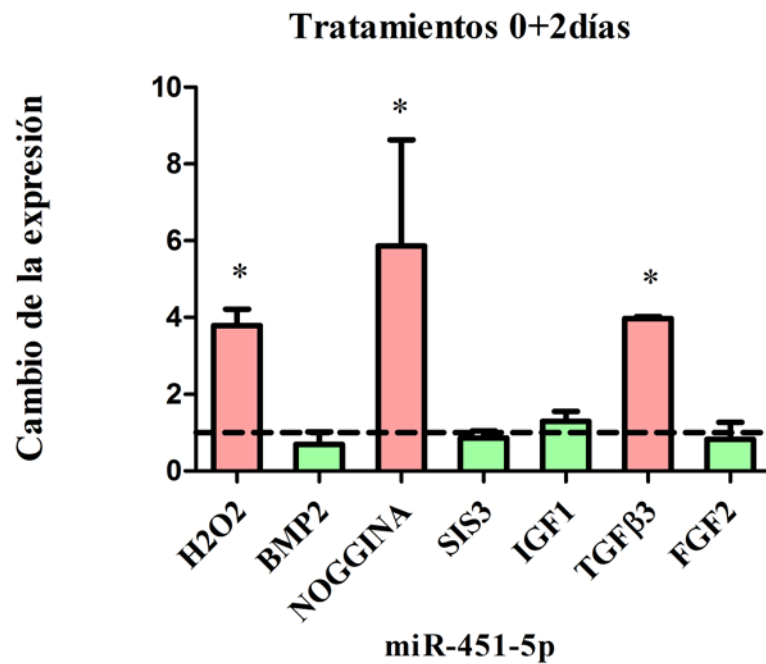


Figura 28: muestra la regulación de miR-451 a consecuencia de los diferentes tratamientos realizados, en los cultivos de micromasas.

Tal como podemos observar, H₂O₂, Noggin y TGFβ3 han producido regulaciones significativas ($p < 0,05$) sobre miR-451, mientras que los tratamientos con BMP2, SIS3, IGF1 y FGF2 no han producido cambios significativos en los niveles de expresión de miR-451 (barras verdes).

El nivel de expresión de cada gen, en los cultivos sin tratar (cultivos control), se ha utilizado como calibrador (línea discontinua).

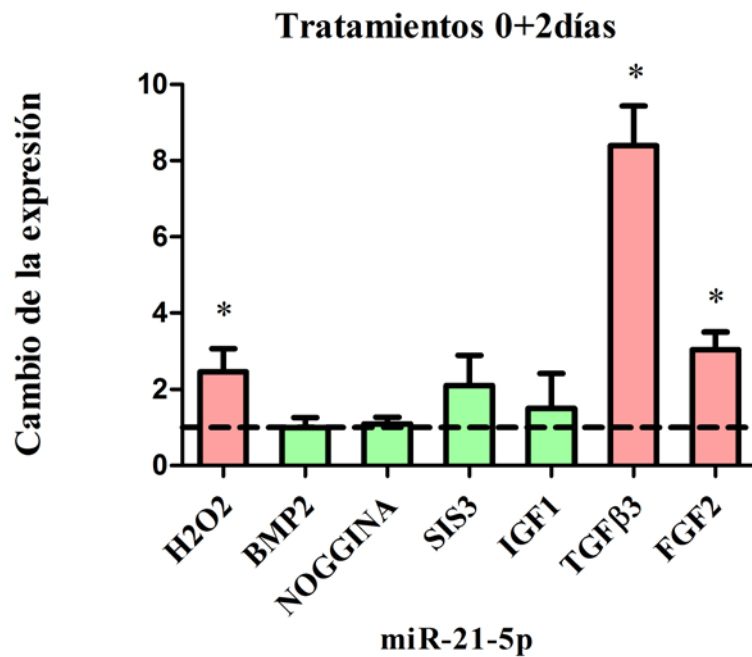


Figura 29: muestra la regulación de miR-21-5p a consecuencia de los diferentes tratamientos realizados, en los cultivos de micromasas.

Tal como podemos observar, H₂O₂, TGFβ3 y FGF2 han producido regulaciones significativas ($p < 0,05$) sobre miR-21, mientras que los tratamientos con BMP2, Noggin, SIS3 y IGF1 no han producido cambios significativos en los niveles de expresión de miR-21 (barras verdes).

El nivel de expresión de cada gen en los cultivos sin tratar (cultivos control), se ha utilizado como calibrador (línea discontinua).



DISCUSIÓN

Los microRNA constituyen un importante mecanismo epigenético de gran eficiencia en el control de numerosos procesos biológicos. Algunos microRNA están involucrados en el desarrollo de la extremidad (Carraco et al., 2014; Celli et al., 2003; Darnell et al., 2006; de Pontual et al., 2011; Hornstein et al., 2005; Huang et al., 2015; Kim et al., 2010; Lancman et al., 2005; Penzkofer et al., 2014; Penzkofer et al., 2014; Song et al., 2011; Song et al., 2013; Zhang et al., 2011), aunque actualmente, el conocimiento sobre el papel que desempeñan en su morfogénesis es limitado.

En la presente Tesis hemos tratado de encontrar evidencias sobre la implicación, de los microRNA, en los eventos que conducen a eliminación del tejido presente en el espacio interdigital durante la morfogénesis de los dedos. Numerosos trabajos, realizados en modelos tumorales, han demostrado la participación de estas moléculas en la regulación de la muerte celular (Chen et al., 2014)

La regresión del tejido del espacio interdigital durante la etapa embrionaria, es uno de los ejemplos más característicos de muerte celular programada. Participa en el esculpido de la forma de los dedos, además, la intensidad de este proceso, es responsable de la existencia de una amplia diversidad en la morfología de los dedos. Ejemplos de esta diversidad morfogénica son: el desarrollo de las extremidades anteriores en los murciélagos (Weatherbee et al., 2006), la conservación de membranas interdigitales más o menos amplias en aves acuáticas (Hurle y Climent, 1987; Hurle et al., 1996), en mamíferos nadadores (Bejder y Hall, 2002) y también la extraordinaria variedad de morfologías del autopodio que caracterizan a algunos reptiles (tortuga o el camaleón; Diaz y Trainor, 2015) y anfibios (Shimizu-Nishikawa et al., 2012).

En contra de las interpretaciones más simples, que consideran la eliminación del tejido del interdígito como un proceso de apoptosis en masa, desde el punto de vista estructural, esta incluye: la eliminación de las células progenitoras esqueléticas situadas en los interdígitos, la degradación de la matriz extracelular (Debeer et al., 2002; McCulloch et al., 2009) y la eliminación de los vasos sanguíneos y del epitelio ectodérmico que recubre la extremidad (Hurle et al., 1985; Hurle y Ganan, 1986).

En lo que concierne al mecanismo por el cual se eliminan las células, éste no solo incluye lo que podíamos denominar “apoptosis canónica”, regulada por la vía intrínseca de muerte celular y ejecutada por caspasas (vía mitocondrial; Zuzarte-Luis y Hurle, 2005; Zuzarte-Luis et al., 2006), en el proceso también participan una multitud de rutas degradativas moleculares, incluyendo: daño precoz del DNA (Montero et al., 2016), activación lisosomal (Montero et al., 2010; Zuzarte-Luis et al., 2007; Zuzarte-Luis et al., 2007), autofagia (Montero et al., 2010), inhibición de la proliferación celular (Becic et al., 2016; Kawakami et al., 2003; Montero et al., 2001; Toné et al., 1988), senescencia celular (Lorda-Diez et al., 2015a; Lorda-Diez et al., 2015b), eliminación por fagocitosis de las células muertas (Wood et al., 2000) y muy posiblemente otros procesos como la necrosis o la activación de la ruta extrínseca de muerte celular (Svandova et al., 2016).

Estos aspectos apuntan a que la participación de los microARN es compleja, pudiendo ser total o parcialmente responsables de alguno o todos los fenómenos degenerativos descritos anteriormente. Esta hipótesis, concuerda con el gran número de microRNA regulados durante la desaparición del tejido del interdígito observado en este estudio.

El análisis comparativo de los microRNA expresados en el interdígito del embrión de pollo al inicio y en el punto de máxima degradación, mediante secuenciación masiva, nos ha permitido identificar cientos de microRNA expresados diferencialmente en ambos periodos. Sin embargo, la complejidad derivada del enorme número de microRNA y, dado que en la regresión participan el mesénquima indiferenciado de los interdígitos junto a otros componentes tisulares cuantitativamente minoritarios, como los vasos sanguíneos y el ectodermo, se ha restringido el análisis a los más abundantes. Por ello, se ha establecido un corte que elimine los microRNA en los que el número de transcritos no exceda de 750 por millón, asumiendo el riesgo de que este hecho, podría hacer que se pierda la identificación de algún microRNA del mesénquima interdigital en el proceso. No obstante, se ha considerado, que la población mayoritaria de células son los progenitores interdigitales, que por otro lado, son los que se desean analizar en este trabajo.

El primer aspecto que resalta de los resultados es el gran número de microRNA expresados en el tejido, a pesar de que en el estadio 32 HH presenta elevados niveles de degradación, incluyendo acidificación del pH extracelular (Montero et al., 2010). Sería razonable, asumir que, al igual que ocurre en los microRNA presentes en líquidos circulantes, los microRNA en el interdígito estén de alguna manera protegidos para evitar su degradación, como por ejemplo, mediante la liberación de exosomas por las células en curso de degradación, que a su vez, podría ser un mecanismo de distribución de microRNA hacia las células vecinas, ya que de otra manera no tendría sentido una transcripción tan amplia y variada. En el proceso de maduración de los folículos ováricos, se ha visto que así se regulan genes como ACR1 e ID2, que además, participan en la diferenciación de los tejidos del autopodio (da Silveira et al., 2012; da Silveira et al., 2014).

Una interpretación adecuada de nuestros datos implica descartar que su regulación no esté asociada a la regresión del interdígito, sino a la maduración del tejido. Una vez clarificado este aspecto, es necesario considerar en primer lugar, la gran variedad de procesos celulares que ocurren durante la degradación del interdígito (descritos anteriormente) y, en segundo lugar, que la participación puede ser tanto directa —inhibiendo la acción de los RNA mensajeros—, como de forma indirecta —haciendo que a través de la inducción y/o inhibición de la diferenciación y/o proliferación celular, puedan hacer a las células más o menos sensibles a señales directas de muerte celular, senescencia o fagocitosis—.

La confirmación de las regulaciones, previamente detectadas por secuenciación, se ha corroborado por q-PCR. Se ha observado, que estos microRNA se expresan preferentemente en el interdígito, ya que su nivel de expresión en los radios digitales es menor.

Finalmente, los datos obtenidos a partir del análisis de la regulación de microRNA observada en las muestras de interdígito de pato (*Anas platyrhynchos*), durante los periodos pre-apoptótico, apoptótico y posapoptótico, apoyan la implicación de los microRNA regulados en el proceso de remodelación del tejido presente en el interdígito.

1. MICRORNA REGULADOS POSITIVAMENTE DURANTE LA REGRESIÓN DEL TEJIDO

Mediante el análisis bioinformático empleando el programa DIANA-miRPath v3.0 (Vlachos et al., 2015; Vlachos y Hatzigeorgiou, 2017), destaca la posible convergencia funcional de los microRNA regulados positivamente en la adhesión celular, incluyendo los microRNA, miR-181a, miR-30a, miR-153, miR-10b, miR-10a, miR-203a, miR-107, miR-9, y el miR-2964. Merece la pena destacar que uno de los mecanismos de muerte propuestos para la regresión interdigital es la anoikis (Diaz-Mendoza et al., 2013), un proceso degradativo producto de la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular (Frisch y Ruoslahti, 1997; Frisch and Screaton, 2001). El papel de los microRNA modulando las propiedades adhesivas y por lo tanto invasivas en modelos tumorales está sobradamente reportado (Cao et al., 2016; McCubrey et al., 2016).

Otra de las rutas identificadas mediante DIANA-miRPath v3.0 es la proteólisis mediada por ubiquitinación, incluyendo en esta ruta: miR-181a, miR-30a, miR-153, miR-10b, miR-10a, miR-148a, miR-203a, miR-107, miR-21, miR-101, miR-140, y el miR-2964. Esta ruta es responsable de la degradación selectiva de proteínas de vida corta necesarias para mantener algunas funciones celulares. Se activa para inhibir la apoptosis debida a la acumulación de proteínas anormales o innecesarias para la célula. En algunos sistemas está funcionalmente asociada con la autofagia (Guo et al., 2017), aunque su participación directa en la muerte celular embrionaria aún requiere ser mejor caracterizada, la ruta de ubiquitinación podría activarse en asociación a un proceso precoz de daño y reparación del DNA que precede a la apoptosis (Montero et al., 2016).

Otras posibles rutas identificadas por el programa DIANA-miRPath v3.0 son el metabolismo de ácidos grasos, el transporte de RNA y la síntesis de proteoglicanos. La implicación de estas rutas como iniciadoras de la muerte celular, han sido mencionadas en estudios de la regulación de la muerte por secuenciación (Wan et al., 2016), pero su papel en los procesos degenerativos requiere ser confirmado.

Desde el punto vista bibliográfico, algunos de los microRNA regulados positivamente durante la regresión, merecen una discusión más detallada en relación a diversas publicaciones recientes. Varios microRNA, que presentan una

expresión elevada en el tejido del interdígito, se han relacionado con procesos apoptóticos tanto, en modelos de células tumorales como, en células diferenciadas, actuando sobre miembros antiapoptóticos de la familia Bcl2 (Huang et al., 2015; Li et al., 2016a; Ouyang et al., 2012). Destacan en este sentido, miR-181 y miR-30, que, además son los microRNA con expresión más abundante en el interdígito.

Se ha comprobado también que TGF β promueve la expresión de miR-181a en células tumorales de mama, favoreciendo el crecimiento en forma de microesferas no adherentes (Wang et al., 2011). Estos mismos autores han observado que una diana directa de miR-181a es la serina/treonina kinasa ATM (siglas del inglés Atasia Telangiectasia Mutated), un conocido agente antitumorigeno involucrado en la reparación del daño en el DNA (Kastan y Lim, 2000). Curiosamente en nuestro modelo, las células interdigitales son eliminadas incluso por procesos independientes de caspasas tras el fracaso en la reparación del daño del DNA en procesos dependientes de ATM (Montero et al., 2016). En células de cáncer colorectal, mir-148a promueve apoptosis silenciando postranscripcionalmente Bcl2 y generando la activación de la vía intrínseca de muerte celular (Zhang et al., 2011). No obstante, miR-148a, que también está expresado y regulado positivamente a niveles altos en el modelo utilizado, tiene como dianas, en otros tejidos, genes implicados tanto de la vía intrínseca como la extrínseca (Joshi et al., 2015; Liu et al., 2015). En este estudio se ha detectado —tal como se discute más adelante—, la regulación negativa de Bcl2 al sobre-expresar miR-21 que se correlaciona con la regulación positiva al electroporar anti-miR-21.

Las características de la secuencia ENSGALG0000002870 —que está regulada casi 4 veces durante la regresión—, nos permite asumir que se trata del miR-143 (identificado en otras especies) un microRNA con importante función proapoptótica, en diversos tumores (Ma et al., 2017).

miR-451 y miR-144, de este mismo modo, actúan conjuntamente promoviendo apoptosis en células tumorales (Pan et al., 2013). El papel de miR-451, no obstante, será discutido más adelante, ya que es uno de los microRNA elegidos en esta Tesis para realizar una aproximación funcional.

Dentro de los microRNA regulados positivamente, hay que resaltar algunos de ellos cuya función, en otros sistemas, se ha asociado a la inflamación y senescencia

celular, como por ejemplo, miR-21 y miR-146c (Olivieri et al., 2015). No obstante, este último no muestra diferencias dígito-interdígito que sustenten su implicación en la diferenciación.

Varios grupos investigadores —incluido el nuestro—, han demostrado, que la senescencia celular ocupa un lugar importante en la regresión de los interdigitos (Lorda-Diez et al., 2015a; Lorda-Diez et al., 2015b). Durante este proceso se detiene la proliferación y las células elaboran una serie de productos conocidos como el secretoma asociado a senescencia (SAS) que refuerza las señales responsables de la regresión del tejido.

miRNA-99a, otro de los microRNA regulado positivamente durante la regresión, pero expresado a niveles bajos en el tejido interdigital, participa en modelos tumorales como un factor antiproliferante presentando como diana ILGFR1, mTOR o Akt (Li et al., 2016b; Xia et al., 2016); además, también regula factores involucrados en la vía extrínseca de muerte, la respuesta inflamatoria y la respuesta ante el estrés oxidativo (Sun et al., 2016a; Xing y Ren, 2016). Podría por tanto considerarse a este grupo de microRNA como componentes del SAS.

Algunos de los microRNA regulados positivamente podrían estar involucrados en fenómenos asociados a la regresión, aunque no directamente implicados en el proceso degenerativo. Así, miR-2188, aparece extraordinariamente regulado en el curso de la degeneración, pero el número de transcritos presentes es mínimo. Por ello, puede suponerse que, atendiendo a su función angiogénica en otros sistemas (Soares et al., 2012), en el interdígito pueda estar implicado en la diferenciación y/o degeneración de los vasos.

2. MICRORNA REGULADOS NEGATIVAMENTE DURANTE LA REGRESIÓN DEL TEJIDO

El análisis bioinformático empleando el programa DIANA-miRPath v3.0 (Vlachos et al., 2015; Vlachos y Hatzigeorgiou, 2017), sugiere que la funcionalidad de los miRNA regulados negativamente, podrían incidir en las mismas rutas que los regulados positivamente —aunque sus dianas sean diferentes (ver tablas 13 y 14)—, como por ejemplo, la identificación de factores implicados en las interacciones entre células y matriz extracelular de posible participación en procesos de anoikis.

Es reseñable, en este sentido, que miR-30c, a diferencia de otros microARN de la familia miR-30, promueve la proliferación celular (Sun et al., 2016b) e inhibe la anoikis (Moreno-Mateos et al., 2013).

Por otro lado, varios de los miRNAs regulados negativamente parecen afectar la señalización mediada por la superfamilia TGF β —este último aspecto se discutirá más adelante—.

Muchos de los microRNA regulados negativamente, se expresan a niveles relativamente bajos. Sin embargo, dentro de este grupo de microRNA algunos como, miR-222a, miR-205, miR-92, miR-454 y miR-30c, destacan por su alto nivel de expresión. De todos ellos, es especialmente significativa la presencia de miR-92. Este es uno de los pocos, cuya pérdida de función genera un fenotipo en las extremidades (Penzkofer et al., 2014), tanto en ratón como en humanos, que es causante del síndrome de Feingold. Los individuos con pérdida de función de miR-92, poseen extremidades de reducido tamaño, con alteraciones importantes en los dedos incluyendo, acortamiento de las falanges intermedias, clinodactilia y, de especial interés para nosotros, niveles variables de sindactilia (de Pontual et al., 2011; Penzkofer et al., 2014; Celli et al., 2003).

miRNA-222a, miR-205, y miR-454, han sido relacionados en otros sistemas como factores antiapoptóticos y promotores de la proliferación celular (Brognara et al., 2016; Lorda-Diez et al., 2015a; Zhang et al., 2015), por tanto, la regulación negativa en el interdígito podría facilitar la regresión del mismo.

La participación de otros microRNA regulados negativamente en el proceso de regresión, tales como, miR-2954, miR-456, miR-429 o miR-106 resulta más difícil de explicar. Sus niveles de expresión son relativamente bajos y no hay datos que apoyen una participación en otros procesos regresivos.

miR-2954 es un microRNA característico de las aves con una expresión en regiones del sistema nervioso que muestran dimorfismo sexual relacionado con el canto (Lin et al., 2014).

miR-456 se ha asociado al mantenimiento de las células de blastodermo en un estado indiferenciado (Lee et al., 2011).

Finalmente miR-429 y miR-106 son “oncomiR” relacionados con migración celular y metástasis (Machackova et al., 2016; Zhang et al., 2015).

3. MICRORNA MODULADORES DE LA SEÑALIZACIÓN TGF β

La vía de señalización TGF β juega un papel esencial tanto a la hora de establecer el destino condrogénico y fibrogénico de las células progenitoras del esqueleto del autopodio, como para determinar la población celular que es eliminada por apoptosis (Lorda-Diez et al., 2009; Macias et al., 1999; Merino et al., 1998; Merino et al., 1999a; Merino et al., 1999c; Montero et al., 2008; Pryce et al., 2009). Estas tres respuestas de las células no están reguladas de forma específica, sino que dependen de balances en la señalización de los miembros de la familia de los TGF β s.

Experimentos de ganancia y de pérdida de función en las extremidades del pollo (Macias et al., 1997; Zou y Niswander, 1996; Zuzarte-Luis et al., 2004), sumados a experimentos de pérdida de función en ratones (Bandyopadhyay et al., 2006; Norrie et al., 2014), han reportado que muchos miembros de la familia de BMP son causantes tanto de la muerte de las células interdigitales (Kaltcheva et al., 2016; Montero et al., 2001; Pajni-Underwood et al., 2007), de la inducción de senescencia (Lorda-Diez et al., 2015a) y de roturas del DNA que preceden a la apoptosis (Garcia-Martinez et al., 1993; Montero et al., 2016; Salas-Vidal et al., 1998). Además, 4 miembros de la familia, el BMP2, el BMP4, BMP5 y BMP7 muestran dominios de expresión en el interdígito que se correlacionan con los patrones de muerte celular (Macias et al., 1997; Montero et al., 2001; Montero y Hurle, 2007; Zuzarte-Luis et al., 2004). Sin embargo, también se ha demostrado que los mismos BMP aplicados en la punta de los dedos en periodos de crecimiento, no solo no inducen muerte, sino que causan un crecimiento dramático del cartílago (Ganan et al., 1998; Macias et al., 1997; Merino et al., 1998; Merino et al., 1999b; Montero et al., 2008). Igualmente, la administración de antagonistas de BMP en la punta de los dedos de los embriones de pollo (Merino et al., 1998; Merino et al., 1999d) y experimentos de silenciamiento de los receptores de los BMP en ratón (Baur et al., 2000; Yi et al., 2000), causan la truncación de los dedos. Por tanto los BMP —que pertenecen a una de las familias de la superfamilia de factores transformantes beta (TGF β) —, son factores capaces de inducir dos efectos antagónicos, muerte y crecimiento, dependiendo de sus dianas celulares.

Nuestro grupo ha observado que otros miembros de la misma superfamilia, las Activinas y los TGF β —en los que la señalización intracelular está mediada por Smad2 y Smad3, a diferencia de los BMP que señalizan por Smad 1, Smad 5 y Smad 8—, son los responsables de modular la respuesta a los BMP.

Estos miembros se expresan preferentemente en la punta de los dedos y su aplicación local en el interdígito, en estadios previos a la muerte celular, cambia por completo el destino de los progenitores interdigitales, de modo que, en lugar de morirse, forman un dedo ectópico (Ganan et al., 1996). En base a estos datos, es difícil predecir, sin realizar experimentos funcionales muy específicos, cuál será el efecto final de los incrementos o pérdidas de función de microRNA moduladores de la señalización por esta vía.

Dentro del panel de microRNAs regulados, existen varios capaces de modular la señalización de los miembros de la superfamilia TGF β .

El análisis bioinformático empleando el programa DIANA-miRPath v3.0 identificó 8 microRNA (miR-15c, miR-205a, miR-106, miR-30c, miR-1456, miR-92, miR-18b, y miR-let-7j) que se regulan negativamente en el curso de la regresión y modifican diferentes miembros incluidos dentro de la cascada de señalización TGF β , entre los que podemos destacar: Smad7 y Smad6, represores de la señalización; Bambi, expresado en el interdígito y antagonista de la señal TGF β actuando como un receptor sin dominio intracelular; y también el receptor tipo II de BMP (BMPRII). Otros microRNA regulados positivamente durante la regresión, como miR-10b (Han et al., 2014) y miR-99a (Zhou et al., 2016) se han descrito, también, como moduladores de la señalización de TGF β y BMP.

En el estudio funcional —que será discutido más adelante—, se ha observado que la sobreexpresión de miR-21 está acompañada de una regulación negativa de *Tgf β 2* y, que este factor de crecimiento promueve la expresión de miR-21, lo que podría sugerir la existencia de un bucle de retroalimentación negativa que contribuyese a establecer la posición de los dedos y los interdígitos. No obstante, con los datos de nuestro estudio, no podemos descartar que se trate de un efecto indirecto.

4. MICRORNA IMPLICADOS EN LA MADURACIÓN DE MACRÓFAGOS Y FAGOCITOSIS

Durante mucho tiempo, la fagocitosis de las células muertas, ha sido considerada como un fenómeno de limpieza de tejido degenerado que contribuía a evitar o acompañaba las reacciones inflamatorias en diversos modelos que requieren la eliminación de células apoptóticas (Elliott y Ravichandran, 2010; Elliott y Ravichandran, 2016). Existen abundantes datos que muestran que, la fagocitosis, juega un papel activo en diversos procesos de muerte celular programada y se ha propuesto para este papel funcional el término de “suicidio asistido” (Johnsen y Horvitz, 2016).

En ratones mutantes deficientes en macrófagos —debido al silenciamiento de factor de transcripción PU.1 requerido para su desarrollo—, sufren un retraso en la regresión de los interdígitos (Wood et al., 2000). En estos ratones, la actividad de fagocitosis es suplida por los progenitores de las extremidades. Algunos datos del presente estudio, sugieren la inclusión de los microRNA regulados en el interdígito en la maduración de macrófagos y en la activación de la actividad fagocítica local. De hecho, la función de PU.1 en la maduración y mantenimiento de la identidad de los macrófagos incluye la regulación negativa de algunos microRNA, como el cluster miR17-92 (Lawrence and Natoli, 2011; Roy, 2016).

Nuestros datos muestran que el miembro de este cluster, miR-92, está expresado a niveles altos en el interdígito y su expresión durante la remodelación del interdígito disminuye casi 10 veces.

Otro miembro del cluster, el miR-18b, también se regula negativamente durante el curso de la regresión, pero sus niveles de expresión son mucho más bajos que los de miR-92. De igual modo, de forma compatible con un papel del perfil de microRNA del interdígito con la maduración de los macrófagos a nivel local, miR-21 que es un promotor de la diferenciación de macrófagos (Roy, 2016; Velu et al., 2009), se expresa a nivel elevado en el interdígito y se regula muy positivamente en el curso de la regresión.

5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MICRORNA INTERDIGITALES

Los datos funcionales —obtenidos en nuestro estudio en los experimentos de ganancia de función— son necesariamente limitados, debido a la imposibilidad de abordar, en una sola Tesis Doctoral, todos los aspectos de este problema. Un estudio completo, requeriría analizar todos los microRNA regulados en el curso de la regresión interdigital, la realización de aproximaciones tanto de ganancia como de pérdida de función, así como una exploración masiva de posibles dianas. En nuestro estudio hemos realizado diversos análisis con el fin de averiguar más sobre las funciones desempeñadas por dos de los microRNA regulados en el interdígito, miR-21 y miR-451. Mediante citometría de flujo, hemos analizado posibles cambios en el ciclo e intensidad de muerte celular. La regulación de un panel potencial de genes diana se ha analizado por qPCR, estos incluyen factores reguladores de la muerte celular y de diferenciación en los destinos característicos de los progenitores situados en el interdígito. Los datos obtenidos sugieren una participación directa o indirecta tanto de miR-451 y de miR-21 en el proceso de remodelación interdigital. El estudio por qPCR de las células transfectadas con los dos miRNA seleccionados ha confirmado que la técnica empleada es seguida de un incremento de más de 100 veces en la expresión del microRNA.

Ninguno de los dos microRNAs seleccionados indujo cambios significativos en el ciclo celular, y ambos causaron un incremento de muerte de intensidad variable. La valoración del incremento de muerte en células sometidas a tratamientos experimentales es siempre un aspecto complicado, ya que cualquier manipulación experimental puede dar lugar a la muerte de las células de forma nada o poco específica. Después de este punto, hay que especificar, que en nuestros experimentos, la intensidad de muerte inducida ha sido diferente y característica para cada microRNA, con diferencias significativas respecto a las células controles transfectadas con el control negativo.

De los dos microRNAs analizados, miR-451 ha resultado ser el inductor de muerte más potente, alcanzando niveles de incremento próximos al 300% en comparación a las células controles. Éste, está fisiológicamente implicado en la eritropoyesis en un amplio número de especies incluyendo el humano, el ratón, y el pez cebra (Pase et al., 2009; Zhan et al., 2007), y su silenciamiento en el ratón no produce fenotipos

en la extremidad (Patrick et al., 2010), sugiriendo una redundancia funcional con otros mecanismos regulatorios. Tal como ha sido discutido anteriormente (apartado microRNA regulados positivamente), miR-451 aparece regulado negativamente en un amplio número de cánceres, dando lugar a la inhibición de la apoptosis y al aumento de la proliferación (Pan et al., 2013). Aunque se desconocen, en gran medida, tanto las causas de su regulación en las células cancerosas como las dianas sobre las que actúa (Pan et al., 2013), se ha sugerido que su regulación, en tumores, es un mecanismo epigenético asociado a hipermetilación del DNA, que puede ser secundario a cambios en la metilación y/o acetilación de histonas (Pan et al., 2013). miR-451 — en nuestro estudio —, fue inducido tras tratamientos con agua oxigenada para incrementar el estrés oxidativo y con TGF β . El estrés oxidativo acompaña al proceso de remodelación del interdígito (Montero et al., 2016) y se ha comprobado que juega un papel importante en la apoptosis interdigital (Eshkar-Oren et al., 2015). Por su parte, tal como se ha indicado anteriormente, la señalización por la superfamilia de los factores transformantes beta, juega un papel central en la determinación de los destinos dígito/interdígito de los progenitores del autopodio. En contraste con el papel de estos factores en el control de la muerte interdigital, miR-451 se regula positivamente por los miembros de la familia que señalizan a través de Smad 2/3 y también, al inhibir la señalización por la vía dependiente de Smad1/5/8 a través de NOGGIN. Dado que los tratamientos con BMP2 no causaron una regulación negativa significativa, la importancia fisiológica de la regulación en cultivos de alta densidad requiere ser confirmada en modelos in vivo.

Respecto a las dianas de miR-451, los datos obtenidos en diferentes modelos de células tumorales humanas, sugieren un efecto sobre la señalización por AKT (Bian et al., 2011; Nan et al., 2010; Tian et al., 2012), que posee un papel fundamental en la supervivencia del tejido mesenquimático de la extremidad en desarrollo (Kawakami et al., 2003). Nuestro análisis transcriptómico en las células interdigitales solamente ha aportado datos indirectos, que incluyen la regulación negativa de los marcadores de diferenciación condrogénica *Sox9* y *Col2a*, acompañados de una regulación positiva de *IGF1*, —un elemento característico de secretoma asociado a senescencia celular presente en el interdígito en regresión

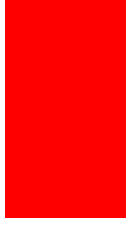
(Lorda-Diez et al., 2015a) —y también un aumento moderado de *Bak*, un elemento central pro-apoptótico responsable del incremento de la permeabilidad mitocondrial (Lorda-Diez et al., 2015b; Montero and Hurle, 2010).

La sobre-expresión del otro microRNA seleccionado para los estudios funcionales, miR-21, ha causado un incremento significativo de la muerte celular de intensidad moderada (150%), menor que la inducida por miR-451, sin producirse cambios significativos en el ciclo celular, de las células transfectadas. El análisis del transcriptómico de las células interdigitales transfectadas, muestra una caída de la expresión de *Bcl2*, de *Sox9* y de *Tgfb2*, mientras que, en los experimentos de pérdida de función, transfectando anti-miR-21, hemos obtenido un incremento moderado, aunque significativo, de la expresión estos genes. Tanto *Sox9* como *Tgfb2* podría explicar la muerte inducida por miR-21 ya que *Sox9* es necesario para la supervivencia de los progenitores esqueléticos y *Tgfb2* al estar aplicado en el interdígito inhibe la muerte e induce la formación de un dedo ectópico (Akiyama et al., 2002; Chimal-Monroy et al., 2003; Ganan et al., 1996). *Bcl2*, es un factor antiapoptotico diana de muchos miRNAs que se regula negativamente en los interdigitos en regresión (Novack y Korsmeyer, 1994). La regulación negativa de *Bcl2* por miR-21 ha sido previamente observada en células cancerosas de la vejiga urinaria (Zhou et al., 2014) y podría explicar el efecto pro-apoptótico de miR-21 en nuestro modelo, sin descartar la posible participación de miR-21 en otras rutas degenerativas.

Tal como hemos mencionado anteriormente, miR-21 se ha relacionado con la maduración de los macrófagos y, en sistemas no embrionarios, con la activación de proteólisis mediada por ubiquitinación (Yang et al., 2015) y la inducción de senescencia y con la inflamación (Olivieri et al., 2015). Es posible por tanto, que este factor pueda formar parte del secretoma asociado a senescencia (SAS), lo que estaría de acuerdo con la regulación positiva de IGF-1 (uno de los miembros del SAS) en las células transfectadas con el pre-miR-21.

En resumen, nuestro estudio identifica y caracteriza funcionalmente de forma parcial, el perfil de microRNA en un ejemplo concreto, donde la muerte celular desempeña un papel esencial en el remodelado anatómico. En conjunto, los datos obtenidos apoyan la participación activa y redundante de estas moléculas en el

proceso muerte celular programada y en senescencia celular asociada al esculpido de los dedos, de modo similar a las observaciones realizadas en estudios de tejidos cancerosos en el humano.



CONCLUSIONES

De nuestro estudio de Tesis Doctoral, derivan las siguientes conclusiones:

1. El elevado número de microRNA identificados, mediante secuenciación masiva del tejido presente en el espacio interdigital, abre un amplio campo de estudio ante las inmensas posibilidades que ofrecen en lo referente a mecanismos de regulación génica.
2. El patrón de expresión diferencial de microRNA, obtenido a partir de los análisis de secuenciación masiva de las células interdigitales en el estadio 29HH que precede a la muerte programada y en el 32HH que corresponde al momento de máxima muerte interdigital, nos ha permitido detectar un total de 71 microRNA con expresiones superiores a 750 lecturas por millón, alguno de los cuales aparecen regulados en el proceso de remodelación del tejido interdigital.
3. La validez de los datos obtenidos por secuenciación masiva se confirmó por qPCR a partir de una selección de 7 microRNA identificados, incluyendo: miR-21 (cadena 3p y 5p), miR-451 (cadena 5p), miR-144 (cadena 3p y 5p), miR-181a (cadena 3p también conocida como miR-213 y 5p), miR-146c (cadena 3p y 5p), miR-92 (cadena 3p y 5p), miR-30a (cadena 3p y 5p).
4. Un total de 20 microRNA aparecían regulados positivamente en el proceso de muerte. Dentro de este grupo destacan por su elevado nivel de expresión y/o regulación miR-181a, miR-451, miR-21, miR-146c, miR-140, miR-30a, miR-10b y miR-148a. A este grupo habría que añadir miR-143, aunque la secuencia que hemos detectado aún no está reconocida como tal en el pollo.
5. Un total de 16 microRNA aparecían regulados negativamente en el proceso de remodelación del interdígito. Dentro de este grupo de microRNA destacan por su elevado nivel de expresión y/o regulación miR-92, miR-222a, miR-30c, miR-205a, y miR-454. En este grupo habría que añadir miR-25, aunque la secuencia que hemos detectado aún no está reconocida como tal en el pollo.
6. El análisis comparativo por qPCR de los niveles de expresión en el interdígito y en los radios digitales de 5 microRNA seleccionados, incluyendo miR-21, miR-451, miR-144, miR-30a, y miR-181a, descarta que las diferencias de expresión entre los estadios 29HH y 32HH, sean debidos a la maduración del tejido y no consecuencia del proceso degenerativo.

7. La correlación entre el proceso degenerativo y la regulación de microRNA ha sido confirmado por qPCR en embriones de pato empleando una selección de 7 miRNAs regulados en el pollo.
8. El análisis por citometría de flujo de los progenitores esqueléticos cultivados después de ser transfectados con miR-21 y miR-451, confirmó de forma directa la implicación de ambos microRNA en la muerte celular.
9. Tanto la inhibición de mir-21 en las células mesenquimales como su sobre-expresión, conducen a la regulación negativa de los genes: *Tgfβ2*, *Sox9* y *Bcl2*, situándolos como potenciales dianas genéticas en el interdígito de este microRNA.
10. En la sobre-expresión de miR-451, destaca la caída significativa del gen *Tgfβ2*, relacionado con la proliferación y diferenciación celular, y muy significativa de *Col2a*, gen que codifica la proteína de mayor abundancia de la matriz extracelular, el colágeno T-II (COL2A1).
11. Tanto miR-21 como miR-451, se regulan positivamente en cultivos tratados con H₂O₂. Este resultado está en consonancia con la implicación del estrés oxidativo en la remodelación del interdígito, propuesto en algunos estudios anteriores.
12. En resumen, los datos obtenidos en el presente estudio apoyan la participación activa y redundante de los microRNA en el proceso muerte celular programada y en senescencia celular asociada al esculpido de los dedos.



BIBLIOGRAFÍA

- **Abrahante, J.E., Daul, A.L., Li, M., Volk, M.L., Tennessen, J.M., Miller, E.A., Rougvie, A.E.** (2003). The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell*. **4**, 625-637.
- **Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.W., Lasitschka, F. et al.** (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* **15**, 978–990.
- **Adams, J.C.** (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**, 25-51.
- **Adams, J.M., Cory, S.** (2007). The Bcl-2-regulated apoptosis switch: mechanism and therapeutic potential. *Cur. Opin. Immunol.* **19**, 488-496.
- **Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., Mukherjee, S.K.** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**, 657-685.
- **Ahmed, A., Ward, N.J., Moxon, S., Lopez-Gomollon, S., Viaut, C., Tomlinson, M.L., Patrushev, I., Gilchrist, M.J., Dalmay, T., Dotlic, D., Munsterberg, A.E., Wheeler, G.N.** (2015). A Database of microRNA Expression Patterns in *Xenopus laevis*. *PLoS One*. **10**:e0138313
- **Ahrens, P.B., Solursh, M., Reiter, R.S.** (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol.* **60**, 69-82.
- **Ahuja, H.S., Zhu, Y., Zakeri, Z.** (1997). Association of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 with apoptotic cell death. *Dev Genet.* **21**, 258-267.
- **Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. and de Crombrughe, B.** (2002). The Transcription Factor Sox9 has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and is Required for Expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813-2828.
- **Alvarez-Garcia, I., Miska, E.A.** (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development.* **132**, 4653-62.
- **Ambros, V.** (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature.* **431**, 350-355.

- **Ambros, V., Lee, R.C, Lavanway, A., Williams, P.T, Jewell, D.** (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.* **13**, 807–818.
- **Amizuka, N., Henderson, J.E., Hoshi, K., Warshawsky, H., Ozawa, H., Goltzman, D., Karaplis, A.C.** (1996). Programmed cell death of chondrocytes and aberrant chondrogenesis in mice homozygous for parathyroid hormone-related peptide gene deletion. *Endocrinology.* **137**, 5055-5067.
- **Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C, Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M.** (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 5003-5008.
- **Ashkenazi, A.** (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* **2**, 420-430.
- **Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. and Tabin, C. J.** (2006). Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis. *PLoS Genet.* **2**, e216.
- **Barna, M., Niswander, L.** (2007). Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell.* **12**, 931-41.
- **Bartel, D.P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* **116**, 281–297.
- **Bartel, D.P.** (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* **136**, 215-33.
- **Baur, S. T., Mai, J. J. and Dymecki, S. M.** (2000). Combinatorial Signaling through BMP Receptor IB and GDF5: Shaping of the Distal Mouse Limb and the Genetics of Distal Limb Diversity. *Development* **127**, 605-619.
- **Becic, T., Bilan, K., Mardesic, S., Vukojevic, K. and Saraga-Babic, M.** (2016). Spatiotemporal Distribution of Proliferation, Proapoptotic and

- Antiapoptotic Factors in the Early Human Limb Development. *Acta Histochem.* **118**, 527-536.
- **Bejarano, F., Smibert, P., Lai, E.C.** (2010). miR-9a prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila* LIM-only. *Dev Biol.* **338**, 63-73.
 - **Bejder, L. and Hall, B. K.** (2002). Limbs in Whales and Limblessness in Other Vertebrates: Mechanisms of Evolutionary and Developmental Transformation and Loss. *Evol. Dev.* **4**, 445-458.
 - **Benjamin, M., Kumai, T., Milz, S., Boszczyk, B.M., Boszczyk, A.A., Ralphs, J.R.** (2002) The skeletal attachment of tendons — tendon ‘entheses’. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **133**, 931–945.
 - **Bhattacharya, M., Sharma, A.R., Sharma, G, Patra, B.C., Nam, J.S., Chakraborty, C., Lee, S.S.** (2016). The crucial role and regulations of miRNAs in zebrafish development. *Protoplasma.* **254**, 17-31.
 - **Bi, W., Huang, W., Whitworth, D.J., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B.** (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6698-6703.
 - **Bian, H. B., Pan, X., Yang, J. S., Wang, Z. X. and De, W.** (2011). Upregulation of microRNA-451 Increases Cisplatin Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line (A549). *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 20-9966-30-20.
 - **Bizuayehu, T.T., Babiak, J., Norberg, B., Fernandes, J.M., Johansen, S.D., Babiak, I.** (2012). Sex-biased miRNA expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brain and gonads. *Sex Dev.* **6**, 257-266.
 - **Bökel, C., Brown, N.H.** (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell.* **3**, 311–321.
 - **Bonnin, M.A., Laclef, C., Blaise, R., Eloy-Trinquet, S., Relaix, F., Maire, P., Duprez, D.** (2005). Six1 is not involved in limb tendon development, but is expressed in limb connective tissue under Shh regulation. *Mech Dev.* **122**, 573-85.

- **Bornstein, P.** (2001). Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest.* **107**, 929–934.
- **Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M.** (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell.* **113**, 25-36.
- **Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M.** (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* **3**, e85.
- **Brent, A.E., Schweitzer, R., Tabin, C.J.** (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell.* **113**, 235–248.
- **Brodersen, P., Voinnet, O.** (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* **22**, 268-280.
- **Brognara, E., Fabbri, E., Montagner, G., Gasparello, J., Manicardi, A., Corradini, R., Bianchi, N., Finotti, A., Breveglieri, G., Borgatti, M. et al.** (2016). High Levels of Apoptosis are Induced in Human Glioma Cell Lines by Co-Administration of Peptide Nucleic Acids Targeting miR-221 and miR-222. *Int. J. Oncol.* **48**, 1029-1038.
- **Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R.** (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957–1966.
- **Campisi, J.** (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo.* **14**, 183-188.
- **Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F., Castagnola, P.** (1995). Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol.* **159**, 265-358.
- **Cao, M. X., Jiang, Y. P., Tang, Y. L. and Liang, X. H.** (2016). The Crosstalk between lncRNA and microRNA in Cancer Metastasis: Orchestrating the Epithelial-Mesenchymal Plasticity. *Oncotarget.* (in press).
- **Carlberg, A.L., Tuan, R.S., Hall, D.J.** (2000). Regulation of scleraxis function by interaction with the bHLH protein E47. *Mol Cell Biol Res Commun.* **3**, 82-86.

- **Carlsson, S.V., Roobol, M.J.** (2017). Improving the evaluation and diagnosis of clinically significant prostate cancer in 2017. *Curr Opin Urol* (in press)
- **Carraco, G., Goncalves, A. N., Serra, C. and Andrade, R. P.** (2014). MicroRNA Processing Machinery in the Developing Chick Embryo. *Gene Expr. Patterns* **16**, 114-121.
- **Carthew, R.W., Sontheimer, E.J.** (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. **136**, 642-655.
- **Carthew, R.W., Sontheimer, E.J.** (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. **136**, 642-655.
- **Celli, J., van Bokhoven, H. and Brunner, H. G.** (2003). Feingold Syndrome: Clinical Review and Genetic Mapping. *Am. J. Med. Genet. A*. **122A**, 294-300.
- **Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Liu, B., Huang, J., Wang, J. H. and Wei, Y. Q.** (2014). Oncogenic and Tumor Suppressive Roles of microRNAs in Apoptosis and Autophagy. *Apoptosis* **19**, 1177-1189.
- **Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Ganán, Y., Macías, D., Merino, R. and Hurle, J. M.** (2003). Analysis of the Molecular Cascade Responsible for Mesodermal Limb Chondrogenesis: Sox Genes and BMP Signaling. *Dev. Biol.* **257**, 292-301.
- **Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio. M,V, Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., et al.** (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 13944-13949
- **Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M.** (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. **22**, 8590-8607.
- **Covarrubias, L., Hernandez-Garcia, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregon, S.** (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?. *Dev Biol*. **320**, 1-11
- **Crick, F.** (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*. **227**, 561-563.

- **da Silveira, J. C., Carnevale, E. M., Winger, Q. A. and Bouma, G. J.** (2014). Regulation of ACVR1 and ID2 by Cell-Secreted Exosomes during Follicle Maturation in the Mare. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 44.
- **da Silveira, J. C., Veeramachaneni, D. N., Winger, Q. A., Carnevale, E. M. and Bouma, G. J.** (2012). Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication within the Ovarian Follicle. *Biol. Reprod.* **86**, 71.
- **Dai, L., Zhang, X., Hu, X., Zhou, C., Ao, Y.** (2012). Silencing of microRNA-101 prevents IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* **14**:R268.
- **Darnell, D. K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J. H., Yatskievych, T. A. and Antin, P. B.** (2006). MicroRNA Expression during Chick Embryo Development. *Dev. Dyn.* **235**, 3156-3165.
- **de Pontual, L., Yao, E., Callier, P., Faivre, L., Drouin, V., Cariou, S., Van Haeringen, A., Genevieve, D., Goldenberg, A., Oufadem, M. et al.** (2011). Germline Deletion of the miR-17 Approximately 92 Cluster Causes Skeletal and Growth Defects in Humans. *Nat. Genet.* **43**, 1026-1030.
- **Debeer, P., Schoenmakers, E. F., Twal, W. O., Argraves, W. S., De Smet, L., Fryns, J. P. and Van De Ven, W. J.** (2002). The Fibulin-1 Gene (FBLN1) is Disrupted in a t(12;22) Associated with a Complex Type of Synpolydactyly. *J. Med. Genet.* **39**, 98-104.
- **Delbridge, A.R., Strasser, A.** (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* **22**, 1071-1080.
- **DeLise, A.M., Fischer, L., Tuan, R.S.** (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* **8**, 309-334.
- **Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., Leder, P.** (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell.* **84**, 911-921.
- **Derfoul, A., Perkins, G.L., Hall, D.J., Tuan, R.S.** (2006). Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells.* **24**, 1487-1495.

- **Dewson, G., Kluck, R.M.** (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Sci.* **122**, 2801-2808.
- **Diaz, R. E., Jr and Trainor, P. A.** (2015). Hand/foot Splitting and the 'Re-Evolution' of Mesopodial Skeletal Elements during the Evolution and Radiation of Chameleons. *BMC Evol. Biol.* **15**, 184-015-0464-4.
- **Diaz-Mendoza, M. J., Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2013). Interdigital Cell Death in the Embryonic Limb is Associated with Depletion of Reelin in the Extracellular Matrix. *Cell. Death Dis.* **4**, e800.
- **Doench, J.G, Petersen, C.P., Sharp, P.A.** (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* **17**, 438-442.
- **Dreyer, S.D, Naruse, T., Morello, R., Zabel, B., Winterpacht, A., Johnson, R.L., Lee, B., Oberg, K.C.** (2004). Lmx1b expression during joint and tendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets. *Gene Expr Patterns.* **4**, 397-405.
- **Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, A.P.** (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell.* **75**, 1417-1430.
- **Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M.A., Teillet, M.A., Duprez, D.** (2002). Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev Biol.* **247**, 351-366.
- **Elkayam, E., Kuhn C.D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L.** (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell.* **150**, 100-110.
- **Elliott, M. R. and Ravichandran, K. S.** (2010). Clearance of Apoptotic Cells: Implications in Health and Disease. *J. Cell Biol.* **189**, 1059-1070.
- **Elliott, M. R. and Ravichandran, K. S.** (2016). The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev. Cell.* **38**, 147-160.

- **Eshkar-Oren, I., Krief, S., Ferrara, N., Elliott, A. M. and Zelzer, E.** (2015). Vascular Patterning Regulates Interdigital Cell Death by a ROS-Mediated Mechanism. *Development* **142**, 672-680.
- **Fallon, J.F., Kelley, R.O.** (1977). Ultrastruct analysis of the apical ectodermal ridge during vertebrate limb morphogenesis. II. Gap junctions as distinctive ridge structures common to birds and mammals. *J Embryol Exp Morphol.* **41**, 223-232.
- **Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N.** (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* **9**, 102-114.
- **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **39**, 806-811.
- **Fischer, M.S., Blickhan, R.** (2006). The tri-segmented limbs of therian mammals: kinematics, dynamics, and self-stabilization--a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* **305**, 935-952.
- **Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.Y., Campisi, J.** (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* **16**, 238-246.
- **Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P.** (2008). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92-105.
- **Frisch, S. M. and Ruoslahti, E.** (1997). Integrins and Anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 701-706.
- **Frisch, S. M. and Screaton, R. A.** (2001). Anoikis Mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 555-562.
- **Frolova, E.G., Drazba, J., Krukovets, I., Kostenko, V., Blech, L., Harry, C., Vasanji, A., Drumm, C., Sul, P., Jenniskens, G.J., Plow, E.F., Stenina-Adognravi, O.** (2014). Control of organization and function of muscle and tendon by thrombospondin-4. *Matrix Biol.* **37**, 35-48.
- **Gabler, J., Ruetze, M., Kynast, K.L., Grossner, T., Diederichs, S, Richter, W.** (2015). Stage-Specific miRs in Chondrocyte Maturation:

Differentiation-Dependent and Hypertrophy-Related miR Clusters and the miR-181 Family. *Tissue Eng Part A*. **21**, 2840-2851.

- **Gan, S., Huang, Z., Liu, N., Su, R., Xie, G., Zhong, B., Zhang, K., Wang, S., Hu, X., Zhang, J., Xiang, S.** (2016). MicroRNA-140-5p impairs zebrafish embryonic bone development via targeting BMP-2. *FEBS Lett.* **590**, 1438-1446
- **Ganan, Y., Macias, D., Basco, R. D., Merino, R. and Hurle, J. M.** (1998). Morphological Diversity of the Avian Foot is Related with the Pattern of Msx Gene Expression in the Developing Autopod. *Dev. Biol.* **196**, 33-41.
- **Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1996). Role of TGF Beta s and BMPs as Signals Controlling the Position of the Digits and the Areas of Interdigital Cell Death in the Developing Chick Limb Autopod. *Development* **122**, 2349-2357.
- **Garcia-Martinez, V., Macias, D., Ganan, Y., Garcia-Lobo, J. M., Francia, M. V., Fernandez-Teran, M. A. and Hurle, J. M.** (1993). Internucleosomal DNA Fragmentation and Programmed Cell Death (Apoptosis) in the Interdigital Tissue of the Embryonic Chick Leg Bud. *J. Cell. Sci.* **106 (Pt 1)**, 201-208.
- **Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M, Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N.** (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* **5**, 623-628.
- **Goldring, M.B.** (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* **4**, 269–285.
- **Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K.** (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* **97**, 33-44.
- **Grenier, J., Teillet, M-A., Grifone, R., Kelly, R.G., Duprez, D.** (2009). Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PLoS One.* **4**, e4381.
- **Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J.** (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **1**;34.

- **Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engle, P., Lim, L.P., Bartel, D.P.** (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. **27**, 91-105.
- **Gu, S., and Kay, M.A.** (2010). How do miRNAs mediate translational repression? *Silence*. **1**, 11.
- **Guan, Y.J., Yang, X., Wei, L., Chen, Q.** (2011). MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *FASEB J*. **25**, 4457-4466.
- **Guerquin, M.J., Charvet, B., Nourissat, G., Havis, E., Ronsin, O., Bonnin, M.A., Ruggiu, M., Olivera-Martinez, I., Robert, N. et al.** (2013). Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *J Clin Invest*. **123**, 3564-76.
- **Guo, F., He, X., Li, S. and Le, W.** (2016). A Central Role for Phosphorylated p38 α in Linking Proteasome Inhibition-Induced Apoptosis and Autophagy. *Mol Neurobiol*. (In press)
- **Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A.M., Doglio, A., Bertrand, E., Macara, IG., Dargemont, C.** (2002). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem*. **278**, 5505-5508.
- **Ha, M., Kim, V.N.** (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **15**, 509-524.
- **Ham, O., Song, B.W., Lee, S.Y., Choi, E., Cha, M.J., Lee, C.Y., Park, J.H., Kim, I.K., Chang, W., Lim, S., Lee, C.H., Kim, S. et al.,** (2012). The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling. *Biomaterials*. **33**, 4500–4507.
- **Hamburger, V., Hamilton, H.L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn*. **195**, 231-272.
- **Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., Kim, V.N.** (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. **125**, 887-901.

- **Han, X., Yan, S., Weijie, Z., Feng, W., Liuxing, W., Mengquan, L. and Qingxia, F.** (2014). Critical Role of miR-10b in Transforming Growth Factor-beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Gene Ther.* **21**, 60-67.
- **Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., Sczakiel, G.** (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol.* **28**, 655-661.
- **Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W.** (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* **345**, 458-460.
- **Hernandez-Martinez, R., Covarrubias, L.** (2011). Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. *Dev Growth Differ.* **53**, 245-258.
- **Hilton, M.J., Tu, X., Long, F.** (2007). Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by Ihh in growth region cartilage. *Dev. Biol.* **308**, 93-105.
- **Hinchliffe, J.R.** (1982). Cell death in vertebrate limb morphogenesis. In: Progress in Anatomy, Vol. 2. R. J.Harrison and V.Navaratnam, eds. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–19.
- **Hoenicke, L., Zender, L.** (2012). Immune surveillance of senescent cells – biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis.* **33**, 1123–1126.
- **Hornstein, E., Mansfield, J. H., Yekta, S., Hu, J. K., Harfe, B. D., McManus, M. T., Baskerville, S., Bartel, D. P. and Tabin, C. J.** (2005). The microRNA miR-196 Acts Upstream of Hoxb8 and Shh in Limb Development. *Nature* **438**, 671-674.
- **Hou, C., Yang, Z., Kang, Y., Zhang, Z., Fu, M., He, A., Zhang, Z., Liao, W.** (2015). MiR-193b regulates early chondrogenesis by inhibiting the TGF-beta2 signaling pathway. *FEBS Lett.* **589**, 1040-1047.
- **Huang, A.H., Lu, H.H., Schweitzer, R.** (2015). Molecular regulation of tendon cell fate during development. *J Orthop Res.* **33**, 800-812.

- **Huang, P., Ye, B., Yang, Y., Shi, J. and Zhao, H.** (2015). MicroRNA-181 Functions as a Tumor Suppressor in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) by Targeting Bcl-2. *Tumour Biol.* **36**, 3381-3387.
- **Hurle, J. M. and Climent, V.** (1987). The Regression of the Interdigital Tissue in Rallidae Avian Embryos (*Fulica Atrata* and *Gallinula Chloropus*). *Arch. Biol. (Bruxelles)* **98**, 299-316.
- **Hurle, J. M. and Ganan, Y.** (1986). Interdigital Tissue Chondrogenesis Induced by Surgical Removal of the Ectoderm in the Embryonic Chick Leg Bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **94**, 231-244.
- **Hurle, J. M., Colvee, E. and Fernandez-Teran, M. A.** (1985). Vascular Regression during the Formation of the Free Digits in the Avian Limb Bud: A Comparative Study in Chick and Duck Embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **85**, 239-250.
- **Hurle, J. M., Ros, M. A., Climent, V. and Garcia-Martinez, V.** (1996). Morphology and Significance of Programmed Cell Death in the Developing Limb Bud of the Vertebrate Embryo. *Microsc. Res. Tech.* **34**, 236-246.
- **Hurle, J.M., Colvee, E.** (1982). Surface changes in the embryonic interdigital epithelium during the formation of the free digits: a comparative study in the chick and duck foot. *J Embryol Exp Morphol.* **69**, 251-263.
- **Hurle, J.M., Ros, M.A., Climent, V., Garcia-Martinez, V.** (1996). Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microsc Res Tech.* **34**, 236-246
- **Hutvagner, G., Zamore, P.D.** (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* **297**, 2056-2060.
- **Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., Chung, U.I.** (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* **50**, 3561-3573.
- **Ikeda, T., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Ogata, N., Mori, Y., Nakamura, K., Ikegawa, S., Chung, U.I.** (2005). Distinct roles of

- Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab.* **25**, 337-340.
- **Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T. et al.** (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.* **214**, 279-290.
 - **Jafarzadeh, M., Soltani, B.M.** (2016) Hsa-miR-590-5p Interaction with SMAD3 Transcript Supports Its Regulatory Effect on The TGFbeta Signaling Pathway. *Cell J.* **18**, 7-12
 - **Janners, M.Y., Searls, R.L.** (1970). Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol.* **23**, 136-165.
 - **Ji, F., Zhang, H., Wang, Y., Li, M., Xu, W., Kang, Y., Wang, Z., Wang, Z., Cheng, P., Tong, D., Li, C., Tang, H.** (2013). MicroRNA-133a, downregulated in osteosarcoma, suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting Bcl-xL and Mcl-1. *Bone.* **56**, 220-226
 - **Johnsen, H. L. and Horvitz, H. R.** (2016). Both the Apoptotic Suicide Pathway and Phagocytosis are Required for a Programmed Cell Death in *Caenorhabditis Elegans*. *BMC Biol.* **14**, 39-016-0262-5.
 - **Joshi, P., Jeon, Y. J., Lagana, A., Middleton, J., Secchiero, P., Garofalo, M. and Croce, C. M.** (2015). MicroRNA-148a Reduces Tumorigenesis and Increases TRAIL-Induced Apoptosis in NSCLC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 8650-8655.
 - **Jovanovic, M., Hengartner, M.O.** (2006). miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene.* **25**, 6176-6187.
 - **Kaltcheva, M. M., Anderson, M. J., Harfe, B. D. and Lewandoski, M.** (2016). BMPs are Direct Triggers of Interdigital Programmed Cell Death. *Dev. Biol.* **411**, 266-276.
 - **Kamm, R.C., Smith, A.G.** (2009). Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem.* **18**, 519-522.

- **Kappel, A., Keller, A.** (2016). miRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem La.* (in press)
- **Karaplis, A.C, Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R.T., Tybulewicz, V.L., Kronenberg, H.M., Mulligan, R.C.** (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* **8**, 277-289
- **Kastan, M. B. and Lim, D. S.** (2000). The Many Substrates and Functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 179-186.
- **Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., Koth, C. M., Buscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J. K., Esteban, C. R., Takahashi, S., Henrique, D. et al.** (2003). MKP3 Mediates the Cellular Response to FGF8 Signalling in the Vertebrate Limb. *Nat. Cell Biol.* **5**, 513-519.
- **Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T., Gerace, L.** (1999). A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J Cell Biol.* **145**, 645-657.
- **Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**, 239-257.
- **Kieny, M., Chevallier, A.** (1979). Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. *J Embryol Exp Morph.* **49**, 153–165.
- **Kim, D., Song, J. and Jin, E. J.** (2010). MicroRNA-221 Regulates Chondrogenic Differentiation through Promoting Proteosomal Degradation of Slug by Targeting Mdm2. *J. Biol. Chem.* **285**, 26900-26907.
- **Kim, D., Song, J., Kim, S., Chun, C.H., Jin, E.J.** (2011a). MicroRNA-34a regulates migration of chondroblast and IL-1 β -induced degeneration of chondrocytes by targeting EphA5. *Biochem Biophys Res Commun.* **415**, 551–557.
- **Kim, D., Song, J., Kim, S., Kang, S.S., Jin, E.J.** (2011b). MicroRNA-142-3p regulates TGF- β 3-mediated region-dependent chondrogenesis by regulating ADAM9. *Biochem Biophys Res Commun.* **414**, 653–659.

- **Kim, D., Song, J., Kim, S., Park, H.M., Chun, C.H., Sonn, J., Jin, E.J.** (2012). MicroRNA-34a modulates cytoskeletal dynamics through regulating RhoA/Rac1 cross-talk in chondroblasts. *J Biol Chem.* **287**, 12501–12509.
- **Kongcharoensombat, W., Nakasa, T., Ishikawa, M., Nakamae, A., Deie, M., Adachi, N., Mohamed, A., Ochi, M.** (2010). The effect of microRNA-21 on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **18**, 1679-1684.
- **Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T.** (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* **285**, 17442-1752.
- **Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N.** (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* **37**, 495-500.
- **Krizhanovsky, V., Xue, W., Zender, L., Yon, M., Hernando, E., Lowe, S.W.** (2008) Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **73**, 513–522.
- **Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W.** (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* **11**, 597-610.
- **Kuilman, T., Peeper, D.S.** (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer.* **9**, 81-94.
- **Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., Peeper, D.S.** (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* **133**, 1019-1031.
- **Lafferty-Whyte, K., Cairney, C.J., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Keith, W.N.** (2009). Pathway analysis of senescence-associated miRNA targets reveals common processes to different senescence induction mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* **1792**, 341-352.

- **Lai, E.C.** (2002). MicroRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.* **30**, 363-364.
- **Lan, S.H., Wu, S.Y., Zuchini, R., Lin, X.Z., Su, I.J., Tsai, T.F., Lin, Y.J., Wu, C.T., Liu, H.S.** (2014). Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. *Hepatology.* **59**, 505-517
- **Lancman, J. J., Caruccio, N. C., Harfe, B. D., Pasquinelli, A. E., Schageman, J. J., Pertsemlidis, A. and Fallon, J. F.** (2005). Analysis of the Regulation of Lin-41 during Chick and Mouse Limb Development. *Dev. Dyn.* **234**, 948-960.
- **Lau, P.W., Guiley, K.Z., De N, Potter, C.S., Carragher, B., MacRae, I.J.** (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol.* **19**, 436-440.
- **Lawrence, T. and Natoli, G.** (2011). Transcriptional Regulation of Macrophage Polarization: Enabling Diversity with Identity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 750-761.
- **Le, M.T., Shyh-Chang N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H.F., Lim, B.** (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* **23**, 862-876.
- **Leaman, D., Chen, P.Y., Fak, J., Yalcin, A., Pearce, M., Unnerstall, U., Marks, D.S., Sander, C., Tuschl, T., Gaul, U.** (2005). Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in Drosophila development. *Cell.* **121**, 1097-1108.
- **Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V.** (1993). The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* **75**, 843-854.
- **Lee, S. I., Lee, B. R., Hwang, Y. S., Lee, H. C., Rengaraj, D., Song, G., Park, T. S. and Han, J. Y.** (2011). MicroRNA-Mediated Posttranscriptional Regulation is Required for Maintaining Undifferentiated Properties of Blastoderm and Primordial Germ Cells in Chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10426-10431.

- **Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V.N.** (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. **425**, 415–419.
- **Léjard, V., Brideau, G., Blais, F., Salingcarnboriboon, R., Wagner, G., Roehrl, M.H., Noda, M., Duprez, D., Houillier, P., Rossert, J.** (2007) Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- $\alpha 1(I)$ collagen gene in tendon fibroblasts. *J Biol Chem*. **282**, 17665-17675.
- **Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.J., Bonnet, A., Bonnin, M.A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C.B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, P., Rossert, J., Ruggiero, F., Duprez, D.** (2011). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J Biol Chem*. **286**, 5855-5867.
- **Leung, A.K., Sharp, P.A.** (2006). Function and localization of microRNAs in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **71**, 29-38.
- **Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P.** (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. **120**, 15–20.
- **Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B.** (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. **115**, 787–798.
- **Li, Q., Zhang, D., Wang, Y., Sun, P., Hou, X., Lerner, J., Xiong, W., Mi, J.** (2013). MiR-21/Smad 7 signaling determines TGF- $\beta 1$ -induced CAF formation. *Sci Rep*. **3**, 2038
- **Li, X. H., Ha, C. T. and Xiao, M.** (2016a). MicroRNA-30 Inhibits Antiapoptotic Factor Mcl-1 in Mouse and Human Hematopoietic Cells After Radiation Exposure. *Apoptosis*. **21**, 708-720.
- **Li, Y., Zhang, Z., Zhang, X., Lin, Y., Luo, T., Xiao, Z. and Zhou, Q.** (2016b). A Dual PI3K/AKT/mTOR Signaling Inhibitor miR-99a Suppresses Endometrial Carcinoma. *Am. J. Transl. Res*. **8**, 719-731.
- **Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S.** (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*. **17**, 991–1008.

- **Lin, E.A., Kong, L., Bai, X.H., Luan, Y., Liu, C.J.** (2009). miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem.* **284**, 11326-11335.
- **Lin, Y. C., Balakrishnan, C. N. and Clayton, D. F.** (2014). Functional Genomic Analysis and Neuroanatomical Localization of miR-2954, a Song-Responsive Sex-Linked microRNA in the Zebra Finch. *Front. Neurosci.* **8**, 409.
- **Liu, W., Watson, S.S., Lan, Y., Keene, D.R., Ovitt, C.E., Liu, H., Schweitzer, R., Jiang, R.** (2010). The atypical homeodomain transcription factor Mohawk controls tendon morphogenesis. *Mol Cell Biol.* **30**, 4797-4807.
- **Liu, X. Y., He, Y. J., Yang, Q. H., Huang, W., Liu, Z. H., Ye, G. R., Tang, S. H. and Shu, J. C.** (2015). Induction of Autophagy and Apoptosis by miR-148a through the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Hepatic Stellate Cells. *Am. J. Cancer. Res.* **5**, 2569-2589.
- **Livak, K.J., Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**, 402-408.
- **Long, F., Zhang, X.M., Karp, S., Yang, Y., McMahon, A.P.** (2001) Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development.* **128**, 5099-5108.
- **Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., Garcia-Lopez, V., Aranega, A., Garcia-Martinez, V.** (2015). Negative Fgf8-Bmp2 feed-back is regulated by miR-130 during early cardiac specification. *Dev Biol.* **406**, 63-73.
- **Lorda-Diez, C. I., Garcia-Riart, B., Montero, J. A., Rodriguez-Leon, J., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2015a). Apoptosis during Embryonic Tissue Remodeling is Accompanied by Cell Senescence. *Aging (Albany NY).* **7**, 974-985.

- **Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2015b). Interdigital Tissue Regression in the Developing Limb of Vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* **59**, 55-62.
- **Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Martinez-Cue, C., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2009). Transforming Growth Factors Beta Coordinate Cartilage and Tendon Differentiation in the Developing Limb Mesenchyme. *J. Biol. Chem.* **284**, 29988-29996.
- **Lorda-Diez, C.I., Garcia-Riart, B., Montero, J.A., Rodriguez-Leon, J., Garcia-Porrero, J.A., Hurle, J.M.** (2015b). Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging (Albany NY)*. **7**, 974-985
- **Lorda-Diez, C.I., Montero, J.A., Garcia-Porrero, J.A., Hurle, J.M.** (2015a). Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *Int J Dev Biol.* **59**, 55-62
- **Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U.** (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. **303**, 95-98.
- **Ma, Z., Luo, Y. and Qiu, M.** (2017). MiR-143 Induces the Apoptosis of Prostate Cancer LNCap Cells by Suppressing Bcl-2 Expression. *Med. Sci. Monit.* **23**, 359-365.
- **Machackova, T., Mlcochova, H., Stanik, M., Dolezel, J., Fedorko, M., Pacik, D., Poprach, A., Svoboda, M. and Slaby, O.** (2016). MiR-429 is Linked to Metastasis and Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma by Affecting Epithelial-Mesenchymal Transition. *Tumour Biol.* **37**, 14653-14658.
- **Macias, D., Ganan, Y., Rodriguez-Leon, J., Merino, R. and Hurle, J. M.** (1999). Regulation by Members of the Transforming Growth Factor Beta Superfamily of the Digital and Interdigital Fates of the Autopodial Limb Mesoderm. *Cell Tissue Res.* **296**, 95-102.
- **Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M.** (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in Programmed Cell Death and Skeletogenesis during Chick Limb Development. *Development* **124**, 1109-1117.

- **Magenta, A., Dellambra, E., Ciarapica, R., Capogrossi, M.C.** (2016). Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium*. **60**, 207-217
- **Mahen, E.M., Watson, P.Y., Cottrell, J.W., Fedor, M.J.** (2010). mRNA secondary structures fold sequentially but exchange rapidly in vivo. *PLoS Biol.* **8**, e1000307.
- **Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D.** (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. **123**, 607-20.
- **Mattot, V., Raes, M.B., Henriët, P., Eeckhout, Y., Stehelin D., Vandenbunder, B., Desbiens, X.** (1995) Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J Cell Sci.* **108**, 529-35.
- **McCubrey, J. A., Fitzgerald, T. L., Yang, L. V., Lertpiriyapong, K., Steelman, L. S., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., Neri, L. M., Cocco, L. et al.** (2016). Roles of GSK-3 and microRNAs on Epithelial Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells. *Oncotarget*. pp. **14221-14250**.
- **McCulloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wylie JD, Lindner V, Sasaki T, Cooley MA, Argraves WS, Apte SS.** (2009.) ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell*. **17**, 687-698.
- **McDonald, J.S., Milosevic, D., Reddi, H.V., Grebe, S.K., Algeciras-Schimmich, A.** (2011). Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. **57**, 833-840.
- **Meier, P., and Vausden, K.H.** (2007). Lucifer's labyrinth-ten years of path finding in cell death. *Mol. Cell*. **28**, 746-754.
- **Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T. and Hurle, J. M.** (1998). Morphogenesis of Digits in the Avian Limb is Controlled by FGFs, TGFbetas, and Noggin through BMP Signaling. *Dev. Biol.* **200**, 35-45.

- **Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J. and Hurle, J. M.** (1999a). Bone Morphogenetic Proteins Regulate Interdigital Cell Death in the Avian Embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **887**, 120-132.
- **Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N., Wang, X., Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K. T., Varona, P. and Hurle, J. M.** (1999b). Expression and Function of Gdf-5 during Digit Skeletogenesis in the Embryonic Chick Leg Bud. *Dev. Biol.* **206**, 33-45.
- **Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C. and Hurle, J. M.** (1999c). Control of Digit Formation by Activin Signalling. *Development* **126**, 2161-2170.
- **Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N. and Hurle, J. M.** (1999d). The BMP Antagonist Gremlin Regulates Outgrowth, Chondrogenesis and Programmed Cell Death in the Developing Limb. *Development* **126**, 5515-5522.
- **Mikhed, Y., Gorlach, A., Knaus, U.G., Daiber, A.** (2015). Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biol.* **5**, 275-289
- **Montero, J. A. and Hurle, J. M.** (2007). Deconstructing Digit Chondrogenesis. *Bioessays* **29**, 725-737.
- **Montero, J. A. and Hurle, J. M.** (2010). Sculpturing Digit Shape by Cell Death. *Apoptosis* **15**, 365-375.
- **Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A. and Hurle, J. M.** (2001). Role of FGFs in the Control of Programmed Cell Death during Limb Development. *Development.* **128**, 2075-2084.
- **Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Certal, A. C., Moreno, N., Rodriguez-Leon, J., Torriglia, A. and Hurle, J. M.** (2010). Coordinated and Sequential Activation of Neutral and Acidic DNases during Interdigital Cell Death in the Embryonic Limb. *Apoptosis.* **15**, 1197-1210.

- **Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Ganan, Y., Macias, D. and Hurle, J. M.** (2008). Activin/TGFbeta and BMP Crosstalk Determines Digit Chondrogenesis. *Dev. Biol.* **321**, 343-356.
- **Montero, J. A., Sanchez-Fernandez, C., Lorda-Diez, C. I., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2016). DNA Damage Precedes Apoptosis during the Regression of the Interdigital Tissue in Vertebrate Embryos. *Sci. Rep.* **6**, 35478.
- **Montero, J.A., Hurlé, J.M.** (2007). Deconstructing digit chondrogenesis. *Bioessays.* **29**, 725-737.
- **Montero, J.A., Hurlé, J.M.** (2010). Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis.* **15**, 365-375.
- **Moreno-Mateos, M. A., Barragan, V., Torres, B., Rodriguez-Mateo, C., Mendez-Vidal, C., Berezikov, E., Mudduluru, G., Allgayer, H. and Pintor-Toro, J. A.** (2013). Novel Small RNA Expression Libraries Uncover Hsa-miR-30b and Hsa-miR-30c as Important Factors in Anoikis Resistance. *RNA* **19**, 1711-1725.
- **Munoz-Espin, D., Serrano, M.** (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**, 482- 496.
- **Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., Serrano, M.** (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell.* **155**, 1104-1118.
- **Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C.** (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* **123**, 1603-1611.
- **Nagata, S.** (1997). Apoptosis by death factor. *Cell.* **88**, 355-365.
- **Nakamura, Y., Inloes, J.B., Katagiri, T., Kobayashi, T.** (2011). Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Mol Cell Biol.* **31**, 3019-3028.

- **Nakanishi, K.** (2016). Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins?. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **7**, 637-660.
- **Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B.** (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. **108**, 17-29.
- **Nan, Y., Han, L., Zhang, A., Wang, G., Jia, Z., Yang, Y., Yue, X., Pu, P., Zhong, Y. and Kang, C.** (2010). MiRNA-451 Plays a Role as Tumor Suppressor in Human Glioma Cells. *Brain Res*. **1359**, 14-21.
- **Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-suppression of Homologous. *Nature*. **432**, 231-235.
- **Newman, M.A., Hammond, S.M.** (2010). Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev*. **24**, 1086-1092.
- **Nicolas, F.E., Pais, H., Schwach, F., Lindow, M., Kauppinen, S., Moulton, V., Dalmay, T.** (2008) Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140. *RNA*. **14**, 2513-2520.
- **Nicolas, F.E., Pais, H., Schwach, F., Lindow, M., Kauppinen, S., Moulton, V., Dalmay, T.** (2011). mRNA expression profiling reveals conserved and non-conserved miR-140 targets. *RNA Biol*. **8**, 607-615.
- **Ning, G., Liu, X., Dai, M., Meng, A., Wang, Q.** (2013). MicroRNA-92a upholds Bmp signaling by targeting noggin3 during pharyngeal cartilage formation. *Dev Cell*. **24**, 283-295.
- **Norrie, J. L., Lewandowski, J. P., Bouldin, C. M., Amarnath, S., Li, Q., Vokes, M. S., Ehrlich, L. I., Harfe, B. D. and Vokes, S. A.** (2014). Dynamics of BMP Signaling in Limb Bud Mesenchyme and Polydactyly. *Dev. Biol*. **393**, 270-281.
- **Novack, D. V. and Korsmeyer, S. J.** (1994). Bcl-2 Protein Expression during Murine Development. *Am. J. Pathol*. **145**, 61-73.

- **Oberlender, S.A., Tuan, R.S.** (1994). Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*. **120**, 177-187.
- **Ohgawara, T., Kubota, S., Kawaki, H., Kondo, S., Eguchi, T., Kurio, N., Aoyama, E., Sasaki, A., Takigawa, M.** (2009). Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. *FEBS Lett*. **583**, 1006-1010.
- **Oliver, G., Wehr, R., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Cheyette, B.N., Hartenstein, V., Zipursky, S.L., Gruss, P.** (1995). Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*. **121**, 693-705.
- **Olivieri, F., Albertini, M. C., Orciani, M., Ceka, A., Cricca, M., Procopio, A. D. and Bonafe, M.** (2015). DNA Damage Response (DDR) and Senescence: Shuttled Inflamm-miRNAs on the Stage of Inflamm-Aging. *Oncotarget* **6**, 35509-35521.
- **Onyekwelu, I., Goldring, M.B., Hidaka, C.** (2009). Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *J Cell Biochem*. **107**, 383-92.
- **Ouyang, D., Xu, L., Zhang, L., Guo, D., Tan, X., Yu, X., Qi, J., Ye, Y., Liu, Q., Ma, Y. et al.** (2016). MiR-181a-5p Regulates 3T3-L1 Cell Adipogenesis by Targeting Smad7 and Tcf7l2. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **48**, 1034-1041.
- **Ouyang, Y. B., Lu, Y., Yue, S. and Giffard, R. G.** (2012). MiR-181 Targets Multiple Bcl-2 Family Members and Influences Apoptosis and Mitochondrial Function in Astrocytes. *Mitochondrion* **12**, 213-219.
- **Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y. and Lewandoski, M.** (2007). BMP Signals Control Limb Bud Interdigital Programmed Cell Death by Regulating FGF Signaling. *Development* **134**, 2359-2368.
- **Pan, X., Wang, R. and Wang, Z. X.** (2013). The Potential Role of miR-451 in Cancer Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Mol. Cancer. Ther.* **12**, 1153-1162.

- **Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., Campisi, J.** (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol.* **5**, 741-747.
- **Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A.F., Bertholet, V., Remacle, J., Toussaint, O.** (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.* **579**, 3651-3659.
- **Pase, L., Layton, J. E., Kloosterman, W. P., Carradice, D., Waterhouse, P. M. and Lieschke, G. J.** (2009). MiR-451 Regulates Zebrafish Erythroid Maturation in Vivo Via its Target *gata2*. *Blood.* **113**, 1794-1804.
- **Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I.** (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* **408**, 86–89.
- **Patrick, D. M., Zhang, C. C., Tao, Y., Yao, H., Qi, X., Schwartz, R. J., Jun-Shen Huang, L. and Olson, E. N.** (2010). Defective Erythroid Differentiation in miR-451 Mutant Mice Mediated by 14-3-3zeta. *Genes Dev.* **24**, 1614-1619.
- **Penzkofer, D., Bonauer, A., Fischer, A., Tups, A., Brandes, R. P., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S.** (2014). Phenotypic Characterization of miR-92a^{-/-} Mice Reveals an Important Function of miR-92a in Skeletal Development. *PLoS One* **9**, e101153.
- **Pernaute, B., Spruce, T., Smith, K.M., Sánchez-Nieto, J.M., Manzanares, M., Cobb, B., Rodríguez, T.A.** (2014). MicroRNAs control the apoptotic threshold in primed pluripotent stem cells through regulation of BIM. *Genes Dev.* **28**, 1873-1878.
- **Pigati, L., Yaddanapudi, S.C., Iyengar, R., Kim, D.J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L., Duelli, D.M.** (2010). Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One.* **5**, e13515.

- **Pileczki, V., Cojocneanu-Petric, R., Maralani, M., Neagoe, I.B., and Sandulescu, R.** (2016). MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med.* **89**, 50–55.
- **Pryce, B. A., Watson, S. S., Murchison, N. D., Staverosky, J. A., Dunker, N. and Schweitzer, R.** (2009). Recruitment and Maintenance of Tendon Progenitors by TGFbeta Signaling are Essential for Tendon Formation. *Development* **136**, 1351-1361.
- **Rajewsky, N., Socci, N.D.** (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol.* **267**, 529-535.
- **Romano, N., Macino, G.** (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* **6**, 3343-3353.
- **Roy, S.** (2016). MiRNA in Macrophage Development and Function. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 795-804.
- **Saelens, X., Festjens, N., Van de Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P.** (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* **23**, 2861-2874.
- **Sahar, D.E., Longaker, M.T., Quarto, N.** (2005). Sox9 neural crest determinant gene controls patterning and closure of the posterior frontal cranial suture. *Dev Biol.* **280**, 344-361.
- **Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Castro-Obregon, S., Cuervo, R., Escalante-Alcalde, D. and Covarrubias, L.** (1998). Reactive Oxygen Species Participate in the Control of Mouse Embryonic Cell Death. *Exp. Cell Res.* **238**, 136-147.
- **Saunders, J. W., Jr. and Fallon, J. F.** (1967). Cell death in morphogenesis. In *Major Problems in Developmental Biology* (ed. M. Locke) New York: Academic Press. pp. 289-314.
- **Saunders, J.W. jr.** (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool.* **108**, 363-403.

- **Schirle, N.T., MacRae, I.J.** (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science*. **336**, 1037-1040.
- **Schweitzer, R., Chyung, J.H., Murtaugh, L.C., Brent, A.E., Rosen, V., Olson, E.N., Lassar, A., Tabin, C.J.** (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*. **128**, 3855-3866.
- **Screen, H.R., Berk, D.E., Kadler, K.E., Ramirez, F., Young, M.F.** (2015). Tendon functional extracellular matrix. *J. Orthop*. **33**, 793–799.
- **Shimizu-Nishikawa, K., Nishimatsu, S. and Nishikawa, A.** (2012). Strategies to Detect Interdigital Cell Death in the Frog, *Xenopus Laevis*: T3 Accerelation, BMP Application, and Mesenchymal Cell Cultivation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **48**, 313-325.
- **Shin, C., Nam, J.W., Farh, K.K., Chiang, H.R., Shkumatava, A., Bartel, D.P.** (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*. **38**, 789-802.
- **Shukunami, C., Oshima, Y., Hiraki, Y.** (2001). Molecular cloning of tenomodulin, a novel chondromodulin-I related gene. *Biochem Biophys Res Commun*. **280**, 1323-1327.
- **Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., Hiraki Y.** (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol*. **298**, 234-247.
- **Skog, J, Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L, Sena-Esteves, M., Curry, W.T Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O.** (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. **10**, 1470-1476.
- **Soares, A. R., Reverendo, M., Pereira, P. M., Nivelles, O., Pendeville, H., Bezerra, A. R., Moura, G. R., Struman, I. and Santos, M. A.** (2012). Dre-miR-2188 Targets Nrp2a and Mediates Proper Intersegmental Vessel Development in Zebrafish Embryos. *PLoS One* **7**, e39417.

- **Song, J., Kim, D. and Jin, E. J.** (2011). MicroRNA-488 Suppresses Cell Migration through Modulation of the Focal Adhesion Activity during Chondrogenic Differentiation of Chick Limb Mesenchymal Cells. *Cell Biol. Int.* **35**, 179-185.
- **Song, J., Kim, D., Chun, C.H., Jin, E.J.** (2013). MicroRNA-375, a new regulator of cadherin-7, suppresses the migration of chondrogenic progenitors. *Cell Signal.* **25**, 698-706.
- **Song, J., Kim, D., Lee, C.H., Lee, M.S., Chun, C.H., Jin, E.J.** (2013). MicroRNA-488 regulates zinc transporter SLC39A8/ZIP8 during pathogenesis of osteoarthritis. *J Biomed Sci.* **20**, 31.
- **Song, J., Lee, M., Kim, D., Han, J., Chun, C. H. and Jin, E. J.** (2013). MicroRNA-181b Regulates Articular Chondrocytes Differentiation and Cartilage Integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 210-214.
- **Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., Vanacker, J.M., Berta, P., Laudet, V.** (1999). Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *J Mol Evol.* **48**, 517-527.
- **St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P.** (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13**, 2072-2086.
- **Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., Keyes, W.M.** (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell.* **155**, 1119-1130.
- **Subramanian, A., Schilling, T.F.** (2014). Thrombospondin-4 controls matrix assembly during development and repair of myotendinous junctions. *eLife.* **3**, e02372.
- **Suda, N., Itoh, T., Nakato, R., Shirakawa, D., Bando, M., Katou, Y., Kataoka, K., Shirahige, K., Tickle, C., Tanaka, M.** (2014). Dimeric combinations of MafB, cFos and cJun control the apoptosis-survival balance in limb morphogenesis. *Development.* **141**, 2885-2894.

- **Sumiyoshi, K., Kubota, S., Ohgawara, T., Kawata, K., Nishida, T., Shimo, T., Yamashiro, T., Takigawa, M.** (2010). Identification of miR-1 as a micro RNA that supports late-stage differentiation of growth cartilage cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **402**, 286-290.
- **Summerbell, D., Wolpert, L.** (1972). Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing. *Nat New Biol.* **239**, 24-26.
- **Sun, M., Hong, S., Li, W., Wang, P., You, J., Zhang, X., Tang, F., Wang, P. and Zhang, C.** (2016a). MiR-99a Regulates ROS-Mediated Invasion and Migration of Lung Adenocarcinoma Cells by Targeting NOX4. *Oncol. Rep.* **35**, 2755-2766.
- **Sun, T., Li, W. and Ling, S.** (2016b). MiR-30c and Semaphorin 3A Determine Adult Neurogenesis by Regulating Proliferation and Differentiation of Stem Cells in the Subventricular Zones of Mouse. *Cell Prolif.* **49**, 270-280.
- **Sun, W., Li, Y.S., Huang, H.D., Shyy, J.Y., Chien, S.** (2010). microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng.* **12**, 1-27.
- **Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E., Hammonds, R.G., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C.P., Kemp, B.E., Rodriguez, H., Chen, E.Y.** (1987). A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science.* **237**, 893-896.
- **Svandova, E. B., Vesela, B., Lesot, H., Poliard, A. and Matalova, E.** (2016). Expression of Fas, FasL, Caspase-8 and Other Factors of the Extrinsic Apoptotic Pathway during the Onset of Interdigital Tissue Elimination. *Histochem. Cell Biol.* pp: **497–510**
- **Tan, F.J., Zuckerman, J.E., Wells, R.C., Hill, R.B.** (2011). The C. elegans B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) homolog cell death abnormal 9 (CED-9) associates with and remodels LIPID membranes. *Protein Sci.* **20**, 62-74
- **Tao, X., Liu, J., Chen, L., Zhou, Y., Tang, K.** (2015). EGR1 induces tenogenic differentiation of tendon stem cells and promotes rabbit rotator cuff repair. *Cell Physiol Biochem.* **35**, 699-709.

- **Tian, Y., Nan, Y., Han, L., Zhang, A., Wang, G., Jia, Z., Hao, J., Pu, P., Zhong, Y. and Kang, C.** (2012). MicroRNA miR-451 Downregulates the PI3K/AKT Pathway through CAB39 in Human Glioma. *Int. J. Oncol.* **40**, 1105-1112.
- **Tian, Y., Guo, R., Shi, B., Chen, L., Yang, L., Fu, Q.** (2016). MicroRNA-30a promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through inhibiting Delta-like 4 expression. *Life Sci.* **148**, 220-228.
- **Tidball, J.G., Lin, C.** (1989). Structural changes at the myogenic cell surface during the formation of myotendinous junctions. *Cell Tissue.* **257**, 77–84.
- **Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D.** (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science.* **306**, 1377-1380.
- **Toné, S., Tanaka, S. and Kato, Y.** (1988). The Cell Cycle Population Kinetics in the Programmed Cell Death in the Limb-Buds of Normal and 5-Bromodeoxyuridine-Treated Chick Embryos. *Develop. Growth & Differ.* **30**, 261-270.
- **Tuddenham, L., Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Waters, J., Hajihosseini, M.K., Clark, I., Dalmay, T.** (2006). The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett.* **580**, 4214-4217.
- **Tyagi, S., Kramer, F.R.** (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* **14**, 303-308.
- **Velu, C. S., Baktula, A. M. and Grimes, H. L.** (2009). Gfi1 Regulates miR-21 and miR-196b to Control Myelopoiesis. *Blood* **113**, 4720-4728.
- **Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T.** (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* **13**, 423-433.
- **Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., Noël, D.** (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* **27**, 307-314.

- **Vlachos, I. S. and Hatzigeorgiou, A. G.** (2017). Functional Analysis of miRNAs using the DIANA Tools Online Suite. *Methods Mol. Biol.* **1517**, 25-50.
- **Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T. and Hatzigeorgiou, A. G.** (2015). DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA Function with Experimental Support. *Nucleic Acids Res.* **43**, W460-6.
- **Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., Tabin, C.J.** (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* **273**, 613-622.
- **Walczak, H., Krammer, P.H.** (2006). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* **256**, 58-66.
- **Walker, J.C., Harland, R.M.** (2009). microRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina. *Genes Dev.* **23**, 1046-1051.
- **Wan, C., Xiang, J., Li, Y. and Guo, D.** (2016). Differential Gene Expression Patterns in Chicken Cardiomyocytes during Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis. *PLoS One* **11**, e0147950.
- **Wang, B., Guo, J., Feng, L., Suen, C.W., Fu, W.M., Zhang, J.F., Li, G.** (2016). MiR124 suppresses collagen formation of human tendon derived stem cells through targeting *egr1*. *Exp Cell Res.* **347**, 360-366.
- **Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., Galas, D.J.** (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7248-7259.
- **Wang, Y., Yu, Y., Tsuyada, A., Ren, X., Wu, X., Stubblefield, K., Rankin-Gee, E. K. and Wang, S. E.** (2011). Transforming Growth Factor-Beta Regulates the Sphere-Initiating Stem Cell-Like Feature in Breast Cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene* **30**, 1470-1480.
- **Waring, P., Müllbacher, A.** (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and Cell Biology.* **77**, 312-317.

- **Weatherbee, S. D., Behringer, R. R., Rasweiler, J. J., 4th and Niswander, L. A.** (2006). Interdigital Webbing Retention in Bat Wings Illustrates Genetic Changes Underlying Amniote Limb Diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15103-15107.
- **Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., Kluck, R.M.** (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* **1813**, 521-531.
- **Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G.** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* **75**, 855-862.
- **Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S.** (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* **11**, 228-234.
- **Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., McKercher, S. R. and Martin, P.** (2000). Mesenchymal Cells Engulf and Clear Apoptotic Footplate Cells in Macrophageless PU.1 Null Mouse Embryos. *Development* **127**, 5245-5252.
- **Woodman, I.** (2013). Development. EGR1 is a key factor in tendon development and healing. *Nat Rev Rheumatol.* **9**, 505.
- **Wu, X., Ding, N., Hu, W., He, J., Xu, S., Pei, H., Hua, J., Zhou, G., Wang, J.** (2014). Down-regulation of BTG1 by miR-454-3p enhances cellular radiosensitivity in renal carcinoma cells. *Radiat Oncol.* **9**, 179.
- **Xia, M., Li, H., Wang, J. J., Zeng, H. J. and Wang, S. H.** (2016). MiR-99a Suppress Proliferation, Migration and Invasion through Regulating Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Breast Cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 1755-1763.
- **Xing, B. and Ren, C.** (2016). Tumor-Suppressive miR-99a Inhibits Cell Proliferation Via Targeting of TNFAIP8 in Osteosarcoma Cells. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 1082-1090.

- **Xu, J., Kang, Y., Liao, W.M., Yu, L.** (2012). MiR-194 regulates chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by targeting Sox5. *PLoS One*. **7**, e31861.
- **Xu, P., Vernooy, S.Y., Guo, M., Hay, B.A.** (2003). The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*. **13**, 790-795.
- **Yan, C., Wang, Y., Shen, X.Y., Yang, G., Jian, J., Wang, H.S., Chen, G.Q., Wu, Q.** (2011). MicroRNA regulation associated chondrogenesis of mouse MSCs grown on polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials*. **32**, 6435-6544.
- **Yang, C. H., Pfeffer, S. R., Sims, M., Yue, J., Wang, Y., Linga, V. G., Paulus, E., Davidoff, A. M. and Pfeffer, L. M.** (2015). The Oncogenic microRNA-21 Inhibits the Tumor Suppressive Activity of FBXO11 to Promote Tumorigenesis. *J. Biol. Chem*. **290**, 6037-6046.
- **Yang, G., Zhu, L., Hou, N., Lan, Y., Wu, X., Zhou, B., Teng, Y., Yang, X.** (2014). Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res*. **24**, 1266–1269.
- **Yang, J., Qin, S., Yi, C., Ma, G., Zhu, H., Zhou, W., Xiong, Y., Zhu, X., Wang, Y., He, L., Guo, X.** (2011). MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation. *FEBS Lett*. **585**, 2992-2997.
- **Yatsenko, A.S., Shcherbata, H.R.** (2014). Drosophila miR-9a targets the ECM receptor Dystroglycan to canalize myotendinous junction formation. *Dev Cell*. **28**, 335-48.
- **Yi, S. E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V. and Lyons, K. M.** (2000). The Type I BMP Receptor BMPRII is Required for Chondrogenesis in the Mouse Limb. *Development* **127**, 621-630.
- **Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanna, A., Takada, K., Ito, Y., Komori, T.** (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*. **18**, 952-963.

- **Yoshizuka, M., Nakasa, T., Kawanishi, Y., Hachisuka, S., Furuta, T., Miyaki, S., Adachi, N., Ochi, M.** (2016). Inhibition of microRNA-222 expression accelerates bone healing with enhancement of osteogenesis, chondrogenesis, and angiogenesis in a rat refractory fracture model. *J Orthop Sci.* **21**, 852-858.
- **Yue, D., Liu, H., Huang, Y.** (2009). Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Curr Genomics.* **10**, 478-492.
- **Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* **101**, 25-33.
- **Zeng, Y. and Cullen, B.R.** (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.* **280**, 27595–27603.
- **Zeng, Y., Wagner, E.J., Cullen, B.R.** (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell.* **9**, 1327-1333.
- **Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R.** (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 9779-9784.
- **Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R.** (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* **24**, 138–148.
- **Zhan, M., Miller, C. P., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. and Song, C. Z.** (2007). MicroRNA Expression Dynamics during Murine and Human Erythroid Differentiation. *Exp. Hematol.* **35**, 1015-1025.
- **Zhang X, Wang H, Zhang S, Song J, Zhang Y, Wei X, Feng Z.** (2012). MiR-134 functions as a regulator of cell proliferation, apoptosis, and migration involving lung septation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **48**, 131-136.

- **Zhang Z, Hou C, Meng F, Zhao X, Zhang Z, Huang G, Chen W, Fu M, Liao W.** (2015). MiR-455-3p regulates early chondrogenic differentiation via inhibiting Runx2. *FEBS Lett.* **589**, 3671-3678.
- **Zhang, G. J., Li, J. S., Zhou, H., Xiao, H. X., Li, Y. and Zhou, T.** (2015). MicroRNA-106b Promotes Colorectal Cancer Cell Migration and Invasion by Directly Targeting DLC1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 73-015-0189-7.
- **Zhang, H., Li, Y., Huang, Q., Ren, X., Hu, H., Sheng, H. and Lai, M.** (2011). MiR-148a Promotes Apoptosis by Targeting Bcl-2 in Colorectal Cancer. *Cell Death Differ.* **18**, 1702-1710.
- **Zhang, H., Zhang, X., Yuan, X., Wang, L. and Xiao, Y.** (2015). MicroRNA-205 Inhibits Renal Cells Apoptosis Via Targeting CMTM4. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **18**, 1020-1026.
- **Zhang, Z., Kang, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Duan, X., Liu, J., Li, X., Liao, W.** (2012). Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage.* **20**, 1638-1646.
- **Zhang, Z., O'Rourke, J. R., McManus, M. T., Lewandoski, M., Harfe, B. D. and Sun, X.** (2011). The microRNA-Processing Enzyme Dicer is Dispensable for Somite Segmentation but Essential for Limb Bud Positioning. *Dev. Biol.* **351**, 254-265.
- **Zhao, F.L., Hu, G.D., Wang, X.F., Zhang, X.H., Zhang, Y.K., Yu, Z.S.** (2012). Serum overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer. *J Int Med Res.* **40**, 859-866.
- **Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B.** (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn.* **209**, 377-386.
- **Zhong, N., Sun, J., Min, Z., Zhao, W., Zhang, R., Wang, W., Tian, J., Tian, L., Ma, J., Li, D., Han, Y., Lu, S.** (2012). MicroRNA-337 is associated with chondrogenesis through regulating TGFBR2 expression. *Osteoarthritis Cartilage.* **20**, 593-602.
- **Zhou, C., Ding, J. and Wu, Y.** (2014). Resveratrol Induces Apoptosis of Bladder Cancer Cells Via miR21 Regulation of the Akt/Bcl2 Signaling Pathway. *Mol. Med. Rep.* **9**, 1467-1473.

- **Zhou, X., Wang, J., Sun, H., Qi, Y., Xu, W., Luo, D., Jin, X., Li, C., Chen, W., Lin, Z. et al.** (2016). MicroRNA-99a Regulates Early Chondrogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells by Targeting the BMPR2 Gene. *Cell Tissue Res.* **366**, 143-153.
- **Zou, H. and Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP Signaling in Interdigital Apoptosis and Scale Formation. *Science* **272**, 738-741.
- **Zuscik, M.J., Hilton, M.J., Zhang, X., Chen, D., O'Keefe, R.J.** (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest.* **118**, 429-38.
- **Zuzarte-Luis, V. and Hurle, J. M.** (2005). Programmed Cell Death in the Embryonic Vertebrate Limb. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 261-269.
- **Zuzarte-Luis, V., Berciano, M. T., Lafarga, M. and Hurle, J. M.** (2006). Caspase Redundancy and Release of Mitochondrial Apoptotic Factors Characterize Interdigital Apoptosis. *Apoptosis* **11**, 701-715.
- **Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J. C. and Hurle, J. M.** (2007). Lysosomal Cathepsins in Embryonic Programmed Cell Death. *Dev. Biol.* **301**, 205-217.
- **Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Rodriguez-Rey, J. C. and Hurle, J. M.** (2004). A New Role for BMP5 during Limb Development Acting through the Synergic Activation of Smad and MAPK Pathways. *Dev. Biol.* **272**, 39-52.
- **Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Torre-Perez, N., Garcia-Porrero, J. A. and Hurle, J. M.** (2007). Cathepsin D Gene Expression Outlines the Areas of Physiological Cell Death during Embryonic Development. *Dev. Dyn.* **236**, 880-885.
- **Zuzarte-Luis, V., Montero, J.A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J.C., Hurle, J.M.** (2007). Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev Biol.* **301**, 205-217.

ARTÍCULOS

**INTERDIGITAL TISSUE REMODELLING IN THE EMBRYONIC LIMB
INVOLVES DYNAMIC REGULATION OF THE miRNA PROFILES**

Beatriz Garcia-Riart¹, Carlos I. Lorda-Diez¹, Jessica C Marin-Llera ^{1,2}, Juan A Garcia-Porrero,
Juan M. Hurle*, and Juan A. Montero*

From the Departamento de Anatomía y Biología Celular and IDIVAL. Universidad de Cantabria. Santander 39011. Spain.

ACEPTACION

Dear Beatriz Garcia-Riart,

Article ID: JOA12629; Article DOI: 10.1111/joa.12629; Internal Article ID: 14138351

Article title: INTERDIGITAL TISSUE REMODELING IN THE EMBRYONIC LIMB

INVOLVES DYNAMIC REGULATION OF THE miRNA PROFILES

Journal: Journal of Anatomy

Your article has been accepted in Journal of Anatomy – congratulations!

Your article is now with production. You may wish to access Wiley Author Services to view your article record.

Please click here or copy this link into your browser to be taken to your Author Dashboard.

<https://authorservices.wiley.com/index.html#login>

Sincerely,

Wiley Author Services

Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence

Carlos I. Lorda-Diez¹, Beatriz Garcia-Riart¹, Juan A. Montero¹, Joaquín Rodríguez-León², Juan A. García-Porrero¹, and Juan M. Hurlé¹

¹ Departamento de Anatomía y Biología Celular and IDIVAL, Universidad de Cantabria, Santander 39011, Spain;

² Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Extremadura, Badajoz 07006, Spain.

Key words: programmed cell death, senescence, limb development, β -galactosidase, syndactyly, SASP, INZ

Received: 07/01/15; **Accepted:** 11/02/15; **Published:** 11/14/15

Correspondence to: Juan M. Hurlé, PhD; E-mail: hurlej@unican.es

Copyright: Lorda-Diez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Abstract This study re-examined the dying process in the interdigital tissue during the formation of free digits in the developing limbs. We demonstrated that the interdigital dying process was associated with cell senescence, as deduced by induction of β -gal activity, mitotic arrest, and transcriptional up-regulation of p21 together with many components of the senescence-associated secretory phenotype. We also found overlapping domains of expression of members of the Btg/Tob gene family of antiproliferative factors in the regressing interdigits. Notably, *Btg2* was up-regulated during interdigit remodeling in species with free digits but not in the webbed foot of the duck. We also demonstrate that oxidative stress promoted the expression of *Btg2*, and that FGF2 and IGF1 which are survival signals for embryonic limb mesenchyme inhibited *Btg2* expression. *Btg2* overexpression in vivo and in vitro induced all the observed changes during interdigit regression, including oxidative stress, arrest of cell cycle progression, transcriptional regulation of senescence markers, and caspase-mediated apoptosis. Consistent with the central role of p21 on cell senescence, the transcriptional effects induced by overexpression of *Btg2* are attenuated by silencing p21. Our findings indicate that cell senescence and apoptosis are complementary processes in the regression of embryonic tissues and share common regulatory signals.

INTRODUCTION

Normal development requires the coordination of growth and differentiation and the elimination of excess cells in embryonic structures. Digit formation in vertebrate embryonic limbs provides a valuable model of programmed cell death that sculpts interdigital tissue to varying degrees and confers hand/foot (autopod) morphology in accordance with the functional specialization of a species to swim (ducks, and turtles), fly (bats), or walk (chickens, humans, and lizards) [1-4]. Many studies have demonstrated that interdigit regression is a more complex process than initially thought [5-17], it includes massive apoptosis, growth arrest, and matrix remodeling of the interdigits [18]. Several recent studies have proposed that some regressive changes in the embryo include cell senes-

cence that is similar to the senescence induced by oncogenes or senescence-inducing stimuli in adult tissues [19-21]. Digit and interdigit progenitors retain sufficient plasticity to interchange their fates until very advanced stages of development [3]. Therefore, the unraveling of the molecular machinery that determines whether a skeletal progenitor undergoes senescence and cell death or proliferates and differentiates to form a digit is of great biological relevance [22].

Factors that regulate cell cycle progression and/or tumor suppressor signals may be good candidate signals that function downstream of growth factors to control interdigital tissue regression. p53 exerts a central role in the control of most processes of cell senescence, but not in the studied examples of developmental senescence [20]. This finding suggests that other tumor suppressor

