

FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Anatomía molecular del desarrollo embrionario

Molecular anatomy of embryonic development

Autor/a: Marina Ventayol Pérez

Director/es: Juan Antonio Montero Simón

Santander, 16 de Mayo de 2023

IN	D	CF

RESUI	MEN	2
	Resumen y palabras clave	2
	Abstract and key words	2
INTRO	DDUCCIÓN	3-10
OBJET	rivos	10
MATE	RIALES Y MÉTODOS	_11-18
	1. Modelo experimental	11
	2. Tinciones	11-12
	2.1 Tinción vital con Rojo Neutro	11-12
	2.2 Tinción Azul Alcian para cartílago	12
	3. Hibridación <i>in situ</i> en miembros de embriones	12-17
	4. Fijadores, soluciones y tampones utilizados	_17-18
RESUI	LTADOS Y DISCUSIÓN	19-35
1.	Sox9 como marcador del inicio de la diferenciación condrogénica	19-21
2.	<i>Scleraxis,</i> un marcador temprano de diferenciación fibrogénica	22-24
3.	<i>Gdf5</i> un marcador de articulaciones sinoviales durante la formación de los	dedos 25-27
4.	<i>MyoD</i> como marcador de los precursores musculares durante el desarroll extremidad	o de la _28-30
5.	<i>Cyp26A1</i> como marcador de las regiones de muerte interdigital durar estadios de regresión	nte los _31-33
6.	La expresión de BMP2 durante la muerte interdigital y en la maduración articulaciones de los dedos	de las 34-35
CONC	LUSIONES	36-37
AGRA	DECIMIENTOS	38
BIBLIC	DGRAFÍA	39-49

RESUMEN

En este trabajo realizamos una revisión del patrón de expresión de un grupo de genes importantes en la morfogénesis embrionaria de los dedos, utilizando el embrión de pollo, como modelo experimental. En base a la bibliografía científica, y consultando repositorios online como GEISHA, seleccionamos los genes *Sox9, Scleraxis, Gdf5, MyoD, Cyp26A1 y BMP2*. Mediante la técnica de hibridación *in situ* en muestras completas de extremidad embrionaria, hemos obtenido imágenes ilustrativas de sus patrones de expresión a lo largo del desarrollo. Hemos podido así delimitar en el tejido embrionario, las regiones donde se producen procesos celulares en cuya regulación están involucrados estos genes, procesos tales como diferenciación, proliferación, muerte o migración celular.

Los resultados de este trabajo ofrecen un compendio visual de los patrones de expresión de genes clave en el desarrollo de los dedos en el embrión de pollo, confirmando la expresión descrita en la literatura científica. Igualmente realizamos una revisión del papel funcional de estos genes, en los procesos que dirigen la morfogénesis de los dedos partiendo desde el tejido embrionario indiferenciado.

Palabras clave: desarrollo embrionario; morfogénesis de los dedos; hibridación in situ; expresión génica; muerte celular.

ABSTRACT

In this work we review the expression pattern of a group of important genes in the embryonic morphogenesis of the digits, using the chick embryo as an experimental model. Based on the scientific literature, and consulting online repositories such as GEISHA, we selected the *Sox9, Scleraxis, Gdf5, MyoD, Cyp26A1 and BMP2* genes. Using the *in situ* hybridization technique in complete samples of the embryonic limb, we have obtained illustrative images of their expression patterns throughout development. We have thus been able to delimit in embryonic tissue, the regions where cellular processes occur in whose regulation these genes are involved, processes such as cell differentiation, proliferation, death or migration.

The results of this essay offer a visual compendium of the expression patterns of key genes in the development of digits in the chick embryo, confirming the expression described in the scientific literature. We also review the functional role of these genes in the processes that direct the morphogenesis of the digits starting from the undifferentiated embryonic tissue.

Key words: embrionary development; digit morphogenesis; in situ hybridization; gene expression; cell death.

INTRODUCCIÓN

La Biología del Desarrollo es la ciencia que comprende el estudio de los procesos genéticos y moleculares que conducen el desarrollo embrionario. Comprende desde el inicio, con la única célula que constituye el cigoto tras la fecundación, hasta la formación de un organismo complejo, donde se han especificado y se han desarrollado todos los componentes de sus distintos aparatos y sistemas. Esta rama de la Biología nace de la aplicación de las técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética al estudio de la Embriología, para tratar de explicar los procesos del desarrollo embrionario tanto a nivel macroscópico como molecular.

El avance en el conocimiento del desarrollo embrionario humano se ha apoyado históricamente en el estudio de síndromes genéticos que afectan al embrión y al feto en formación (Leslie, 2020). Pero, una gran parte del grueso de nuestro conocimiento, se basa fundamentalmente en la traslación del estudio en modelos animales de vertebrados. Modelos como el pez cebra (e. g. *Danio rerio*), la rana de uñas africana (*Xenopus Laevis*), el pollo (*Gallus gallus*) o el ratón (*Mus musculus*), están siendo de extraordinaria importancia en el conocimiento de los procesos del desarrollo que se establecen en los vertebrados (ver Dunwoodie y Wallingford y las referencias en su artículo).

En el ser humano el desarrollo hasta el momento del nacimiento comprende dos períodos característicos. El primero de ellos es el período embrionario, que se extiende desde el momento de la fecundación hasta la octava semana de desarrollo. El segundo es el periodo fetal, que se inicia tras el periodo embrionario y se prolonga hasta el momento del nacimiento, entre la trigésimo octava semana y la cuadragésimo segunda semana de desarrollo intrauterino (Sadler, 2019). Durante el período embrionario el embrión crece, pero lo más importante que sucede en este período, es el establecimiento del plan corporal y la especificación de la mayor parte de los tejidos que van a dar lugar a los órganos que constituyen los distintos aparatos y sistemas. Durante el período fetal, tiene lugar en mayor medida, fundamentalmente, la maduración y el crecimiento de las estructuras especificadas (Sadler, 2019).

En el período embrionario, durante los procesos de segmentación y la formación de la blástula, se forma por proliferación celular a partir del cigoto, una masa de células pluripotentes, la masa celular interna, que constituye el embrioblasto. Estas células son las conocidas como células madre embrionarias, capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo adulto. El embrioblasto se organiza en el embrión tridérmico por los procesos de gastrulación, con tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), donde van a quedar alojadas células que han restringido su potencialidad, adquiriendo distintos, aunque amplios todavía, compromisos de diferenciación. Estas células pasan a restringir distintas potencialidades en función de la capa en la que queden alojadas. Groso modo, podemos decir que los progenitores celulares alojados: 1) en el ectodermo, darán lugar al sistema nervioso y la epidermis; 2) en el mesodermo, darán lugar al musculoesquelético, la dermis, el aparato circulatorio, la mayor parte del genitourinario y algunos órganos como el bazo; 3) en el endodermo darán lugar al tubo digestivo y órganos asociados.

El embrión tridérmico sufre una serie de procesos de plegamiento lateral y cefalocaudal y así transcurren las tres primeras semanas de desarrollo, momento desde el que, a partir de este molde con cada una de estas tres capas germinales, se van a diferenciar y organizar los distintos aparatos y sistemas. Estos cambios tendrán lugar durante los procesos de neurogénesis y organogénesis posteriores, que culminan el periodo embrionario y se prolongan por el periodo fetal. Recientemente existe un resurgimiento en la investigación en el desarrollo temprano del embrión humano, como se puede apreciar en las extraordinarias revisiones que se están publicando en las mejores revistas científicas, recogiendo aspectos mencionados como los aspectos morfológicos del desarrollo temprano o el control molecular de la potencialidad de las células (ver como ejemplo Płusa y Piliszek, 2020; Rossant y Tam, 2022; Zhai et al., 2022).

A la luz de todo lo descrito hasta ahora, en el estudio de los procesos que gobiernan el desarrollo embrionario, se comprende fácilmente la necesidad de analizar los mecanismos que modulan procesos de diferenciación, maduración y proliferación celular. Igualmente debemos incluir en sintonía e interacción con los mencionados, eventos de migración celular y tisular durante la morfogénesis del embrión. Más difícil de visualizar, sin embargo, es que estos procesos comparten espacio y tiempo con procesos de muerte celular programada, fundamentales para el desarrollo apropiado de aparatos y sistemas (Saunders, 1966). Estos procesos de muerte celular no sólo acompañan el resto de procesos celulares, para que estos sucedan de manera correcta durante el desarrollo embrionario, sino que además tienen un papel morfogenético altamente relevante en la configuración del organismo.

Todos los procesos celulares mencionados tienen un complejo control genético y molecular que los Biólogos del Desarrollo están sólo comenzando a comprender. El desarrollo de animales transgénicos y "knock out" para el estudio del papel de genes concretos en momentos y procesos específicos del desarrollo está siendo de una gran importancia. El desarrollo en los últimos años de la edición genómica de precisión con la tecnología CRISPR/Cas-9 está facilitando enormemente el avance en la generación y estudio de estos animales (Yang et al., 2021). Adicionalmente, el desarrollo de las transfecciones genéticas utilizando vectores de expresión, con la utilización de liposomas o vectores virales atenuados, complementa estos estudios, permitiendo realizar sobrexpresiones o pérdidas de función de genes concretos en lugares específicos del embrión en desarrollo (Montero et al., 2003; Montero et al., 2007). Por otro lado, la utilización de otras herramientas genéticas como los morfolinos antisentido, también han permitido modificar la expresión de genes en embriones en desarrollo y ver sus efectos e inferir su importancia (Montero et al., 2005).

Para estudiar estas aproximaciones experimentales, los investigadores analizan los fenotipos encontrados mediante una gran variedad de técnicas de histología clásica, inmunohistoquímica, bioquímica y biología molecular, combinadas con diversas estrategias de microscopía. Estas van desde la microscopía óptica más sencilla hasta el uso de potentes y sofisticados microscopios con iluminación laser y sistemas ópticos complejos, como puede ser, la microscopía confocal multifotónica. Así por ejemplo, se pueden analizar procesos de muerte celular en un embrión con una simple tinción vital con rojo neutro en un estereomicroscopio con luz fría (Montero et al., 2008); identificar focos de proliferación celular con la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) y

su detección por inmunofluorescencia en un microscopio iluminado con luz ultravioleta (Montero et al., 2008); o seguir procesos de migración celular tras marcar las células con fluoróforos o construcciones que incluyan la proteína verde fluorescente (GFP del inglés Green Fluorescent Protein), y estudiar los procesos migratorios in vivo mediante la microscopía confocal multifotónica con iluminación laser (Montero et al., 2005).

Todo los descrito son estrategias para seguir el impacto sobre la morfogénesis del embrión, de genes de interés de manera experimental en modelos animales. Cuando por algún motivo un investigador está interesado en un gen concreto y su potencial papel en un proceso determinado, una primera aproximación frecuente, antes de adentrarse en estudios de manipulación genética del mismo, es estudiar los patrones de expresión de ese gen en el embrión. Así, por ejemplo, podemos estudiar mediante PCR cuantitativa (QPCR) los niveles de expresión de un gen concreto en un tejido embrionario a lo largo de los distintos estadios de desarrollo. Esto nos da una idea bastante certera del comportamiento de este gen a nivel cuantitativo en una estructura que nos pueda interesar.

Pese a lo anteriormente descrito, normalmente va a resultar incluso más interesante obtener una aproximación cualitativa a la expresión del gen problema. Querremos saber en qué regiones concretas del embrión se expresa, o dentro de un órgano en desarrollo en qué tejido o en qué población celular concreta. Una técnica ampliamente utilizada en Biología del Desarrollo para conocer cualitativamente (e incluso de manera intuitiva cuantitativamente) la expresión de un gen es la hibridación "in situ". Esta técnica consiste en revelar en un embrión los campos de expresión de un gen concreto mediante la identificación de la presencia de sus transcritos, de su RNA mensajero (mRNA), en las células de sus órganos y tejidos (Acloque et al., 2008; Wilkinson and Nieto, 1993). En el apartado de material y métodos de este ensayo se describirá en detalle esta técnica, pero brevemente, podemos decir que se puede visualizar la expresión de un gen de interés, mediante la producción de pequeñas sondas marcadas de RNA antisentido complementarias al mRNA de este gen. Se procesará el embrión tras su obtención y se favorecerán las condiciones para que, al ser expuesto a la sonda marcada, ésta hibride con el mRNA diana en sus células y se mantenga unida de manera estable. Con posterioridad, podremos revelar el territorio de expresión del gen diana, que será donde esta sonda haya hibridado. El revelado se practica con revelados colorimétricos normalmente basado en técnicas inmunohistoquímicas, aprovechando el marcaje de la sonda de RNA anti-sentido hibridada.

La técnica de hibridación *in situ* ha sido y es una herramienta fundamental en el estudio del desarrollo embrionario, pues no sólo nos revela lugares de expresión de un gen concreto a lo largo de la anatomía de un embrión, si no que también nos sirve para descifrar aspectos funcionales. Por ejemplo, mediante hibridación in situ podemos detectar el estado de diferenciación de un grupo de células concretas utilizando genes específicos de diferenciación como marcadores. Así, por ejemplo, podemos utilizar la expresión de *Sox2* para distinguir el ectodermo neural del ectodermo no neural en el embrión temprano al inicio de la neurulación (Pera et al., 1999).

También podemos delimitar los territorios de expresión de genes concretos y utilizarlos como referencias anatómicas para detectar alteraciones en procesos de

migración celular. Por ejemplo, es frecuente en los estudios de migración celular durante la gastrulación en el pez cebra, analizar la expresión por hibridación *in situ* de genes como *Hgg; Dlx3* y *Notail* (Heisenberg et al., 2000; Montero et al., 2003), genes que marcan respectivamente en este caso: el mesendodermo más anterior del embrión que va a dar lugar a la glándula de eclosión; el borde de la placa neural en el ectodermo; y una estructura mesodérmica que determina el eje central del cuerpo embrionario, la notocorda. Si los genes se expresan, puesto que son genes de diferenciación, es que las células no han tenido problemas de diferenciación, de identidad. Pero si vemos alteraciones en los territorios anatómicos que marcan dentro del embrión, es que, presumiblemente, las células han tenido problemas de movilidad al detectar, por ejemplo, una glándula de eclosión retrasada en comparación con la situación control, una notocorda más corta o una placa neural más ancha.

Del mismo modo que los ejemplos que estamos mencionando, podemos identificar los lugares de expresión en un embrión de factores secretados, como pueden ser factores de crecimiento. Por ejemplo, se han llegado a hacer estudios proponiendo gradientes de factores secretados en base a los niveles detectados de expresión de su gen por hibridación *in situ*, como es el caso del factor de crecimiento fibroblástico 8 (*FGF8* del inglés Fibroblast Growth Factor) en la región más caudal del embrión (Dubrulle y Pourquié, 2004). Del mismo modo podemos revelar lugares de acción de un factor de crecimiento o citoquina, analizando por hibridación *"in situ"* la inducción de la expresión de un gen específico de respuesta a este factor (Wang y Beck 2014).

La importancia para los investigadores en Biología del Desarrollo de los patrones de expresión génica, monitorizados por hibridación "in situ", se pone de manifiesto por la presencia de repositorios donde se recogen los patrones de expresión de genes conocidos en distintos modelos biológicos. Así, como ejemplo, podemos citar las siguientes plataformas donde encontraremos estos patrones de expresión, cuyas entradas van creciendo además con el tiempo: Mouse Genome Informatics (MGI) para el embrión de ratón (http://www.informatics.jax.org/); Zebrafish Information Network (ZFIN) para el embrión de pez cebra (https://zfin.org/); o Gallus Expression In Situ Hybridization Analysis (GEISHA) para el embrión de pollo (http://geisha.arizona.edu/geisha/index.jsp). Cobra una especial importancia en este trabajo la plataforma GEISHA, que consiste, como hemos mencionado, en un repositorio online público, que incluye imágenes de hibridación in situ de genes expresados en el embrión de pollo durante los primeros seis días de desarrollo, asociadas a sus correspondientes metadatos.

En este trabajo tenemos como objetivo realizar una revisión de los patrones de expresión de un grupo de genes durante el desarrollo del embrión de pollo por hibridación *"in situ"*. Concretamente vamos a utilizar el modelo del desarrollo de la extremidad con especial atención a la morfogénesis de los dedos. Es un buen modelo, escogido porque en él podemos seguir y detectar tanto fenómenos de diferenciación celular y especificación de los tejidos, como procesos migratorios, de proliferación o de muerte celular.

Las extremidades surgen como dos esbozos en los flancos del embrión (ver figura 1A) siendo inicialmente una estructura muy simple consistente en una masa de células mesodérmicas recubiertas por una caperuza de ectodermo. En el ectodermo, en la región más distal del esbozo, existe una estructura especializada consistente en un engrosamiento denominado Cresta Ectodérmica Apical (AER del inglés Apical Ectodermal Ridge), cuyas células producen factores de crecimiento, fundamentalmente FGF4 y FGF8, lo que mantiene las células subyacentes del mesodermo en estado proliferativo e indiferenciado. Esta zona del mesodermo bajo la influencia de la AER se denomina la Zona de Progreso (PZ del inglés Progress Zone) y presenta una fuerte expresión de FGF10 que retroalimenta la AER (Xu et al., 1998; ver revisión en Jin et al., 2018). La proliferación de las células indiferenciadas de la PZ permite que la extremidad se mantenga en crecimiento, elongándose conforme avanza el desarrollo. En este crecimiento las células que van abandonando la PZ al alejarse de la AER y perder su influencia, comienzan sus procesos de diferenciación que, junto con la morfogénesis de los tejidos, acaban configurando el esqueleto de la extremidad (ver figura 1B).

Y es que, dejando aparte la vasculatura de la extremidad, las células mesodérmicas del esbozo van a dar lugar exclusivamente a los derivados de tejido conectivo de la extremidad, incluyendo cartílago, hueso, articulaciones, tendones y ligamentos (ver revisión en Lorda-Diez et al., 2022). Los músculos y los nervios de la extremidad proceden del tronco y penetran en el esbozo de la extremidad acompañando el desarrollo de esta.

Acompañando los procesos previamente descritos se producen eventos de muerte celular programada de modo que las células mesodérmicas que no se incorporan al tejido esquelético, y han abandonado la PZ son eliminadas cumpliendo un papel morfogenético, especialmente importante en los dedos en formación (figura 1A y 1C; ver revisión en Montero y Hurlé, 2010). En el esbozo temprano aparecen tres regiones de muerte celular conocidas como Zona Necrótica Anterior (ANZ, del inglés Anterior Necrotic Zone), Zona Necrótica Posterior (PNZ, del inglés Posterior Necrotic Zone) y el Área Opaca (OP, del inglés Opaque Patch). Adicionalmente, la cresta ectodérmica apical presenta una importante población de células en degeneración durante todo el desarrollo (figura 1A). Finalmente, como ya describiremos, más tardíamente, durante la morfogénesis de los dedos, se van a establecer unas importantes áreas de muerte celular, las áreas de muerte interdigital (figura 1C), especialmente intensas en las especies con dedos libres (figura 1D).

Conforme crece la extremidad a partir del esbozo inicial en el embrión de vertebrados, se van organizando las distintas regiones en sentido próximo-distal (figura 1B), recibiendo el nombre de Estilopodio (equivalente al brazo y muslo en el adulto), Zeugopodio (equivalente al antebrazo y la pierna) y Autopodio (donde se formará la mano o el pie). Dentro del Autopodio podemos además distinguir el Basipodio en lo que constituirá el carpo/tarso), el metapodio para el correspondiente metacarpo/metatarso y el Acropodio, donde se formarán las falanges. Inicialmente el autopodio, tiene el aspecto de una paleta constituida por un núcleo de mesodermo, cubierto por una caperuza de ectodermo con la AER en la región más distal.



Figura 1. Esqueletogénesis y regiones de muerte celular en el embrión de pollo.

(A y C) Tinción vital de rojo neutro que muestra por un lado las zonas de muerte celular ANZ, PNZ y OP en un embrión de estadio HH22 visto desde el costado derecho (A), así como las INZ en un autopodio de estadio HH31(C). Se observa el patrón de muerte celular interdigital (C), y que la membrana interdigital está ocupada por la INZ casi en su totalidad. (B y D) Tinción de cartílago por azul alcian de la extremidad superior (B) y el autopodio de la extremidad inferior, de un embrión de pollo. En la figura B se observan las tres regiones principales en las que la extremidad se está organizando (estilopodio, zeugopodio y autopodio). En la figura D se muestra el autopodio de una extremidad donde aparecen ya especificadas todas las falanges y el interdígito ha regresionado. En A y B la orientación de las extremidades presenta la región proximal a la izquierda y la distal a la derecha. En C y D las visiones son desde el aspecto dorsal del autopodio derecho, con la región anterior hacia la izquierda y distal hacia arriba.

A la vez que avanza el desarrollo, se producen condensaciones de precursores mesodérmicos con una disposición radial en sentido próximo-distal, en los lugares en los que se van a formar los dedos. A partir de estas condensaciones se formarán los metatarsianos o metacarpianos, las falanges y articulaciones de los dedos, y asociados a estos, las condensaciones que darán lugar a los tendones asociados. La formación del esqueleto de la extremidad tiene lugar por osificación endocondral, de modo que encontramos un paso intermedio en el que se configura un esqueleto cartilaginoso, donde las células mesodérmicas indiferenciadas del autopodio, llevan a cabo diferenciación condrogénica tras abandonar la zona de progreso (Montero y Hurlé, 2007; Montero y Hurlé, 2010). Con posterioridad el esqueleto cartilaginoso será reemplazado por hueso. Por otro lado, los tendones se asociarán a las fibras musculares de los vientres que penetran y se moldean en el autopodio por diferentes procesos morfogenéticos (Kardon, 1998; Rodríguez-Guzmán et al., 2007).

En el autopodio encontramos un ejemplo paradigmático, en el que la muerte celular desempeña un papel fundamental en la morfogénesis animal de vertebrados y ocurre en el tejido del espacio interdigital, durante la formación de los dedos (Montero y Hurlé., 2010). La amplia diversidad morfológica entre los dedos de diferentes especies de vertebrados, en parte se debe a la variación en la intensidad de la regresión de dicho tejido. En especies con dedos libres la muerte celular interdigital es intensa. Sin embargo, esta disminuye dramáticamente en especies donde los dedos en el adulto no aparecen libres: como los dedos palmeados de los patos (Merino et al., 1999a); durante la formación del patagio de los murciélagos (Weatherbee, et al., 2006; Hockman, et al., 2008); o incluso en el desarrollo de la propia aleta del delfín (Cooper et al., 2018). Inicialmente esta muerte se consideró como "necrosis celular", y por ello aún hoy en día las áreas de muerte interdigital se denominan zonas necróticas interdigitales (INZ del inglés Interdigital Necrotic Zones; figura 1C). Posteriormente, con el avance de los estudios morfológicos, comparando las células muertas de tejidos embrionarios y tumorales, se propuso el término de "apoptosis", que recoge aquellas células en las que la muerte celular no genera una reacción periférica inflamatoria, y su morfología se caracteriza por la condensación y fragmentación celular (Kerr et al., 1972; Lorda-Diez et al., 2015).

En este trabajo vamos a utilizar el embrión de pollo (*Gallus gallus*) como modelo animal de experimentación en Biología de Desarrollo. Abordaremos la formación de los dedos, como problema bajo estudio. Este campo experimental seleccionado, cumple la premisa de permitirnos trabajar sobre la mayor parte de procesos celulares y tisulares de interés, durante la morfogénesis animal de vertebrados, como son, entre otros: la diferenciación celular, la proliferación celular, la muerte celular y la migración celular. Haremos una revisión de los patrones de expresión de factores clave relacionados con estos procesos, en la formación de los dedos mediante la técnica de hibridación "*in situ*". Detallaremos la expresión de: *SRY-Related HMG-Box Gene 9 (Sox9)* como gen condrogénico característico; *Scleraxis (Sclx)* como marcador más temprano descrito de tejido fibrogénico, es decir, tendones y ligamentos en nuestro modelo; *Growth and Differentiation Factor 5 (Gdf5)* como marcador estándar de la formación de las articulaciones; *Bone Morphogetic protein 2 (BMP2)* como factor promotor de la muerte interdigital; Cytochrome P450 26A1 (Cyp26A1) como enzima moduladora de la producción de ácido retinoico (RA), involucrado tanto en la condrogénesis digital como en la modulación de la muerte celular interdigital; y *MyoD* como factor de diferenciación miogénica. La monitorización de estos factores por hibridación *in situ*, nos revelará la "anatomía molecular" de estos procesos durante la morfogénesis de los dedos.

OBJETIVOS

En este Trabajo de Fin de Grado hemos querido analizar en detalle la expresión de determinados genes en el desarrollo de las extremidades del embrión de pollo (*Gallus gallus*), tomando este como modelo paradigmático en Biología del Desarrollo de especies de vertebrado con dedos libres. Abordamos el problema de la morfogénesis de los dedos, proceso durante el cual, a partir de precursores indiferenciados que constituyen el esbozo inicial de la extremidad, se producen eventos de diferenciación celular, proliferación y muerte celular o migración celular entre otros.

Una revisión de la bibliografía científica nos sugiere que, entre otros, es clave la correcta expresión de los siguientes genes para el desarrollo de las extremidades: *Sox9; Scleraxis; Gdf5; Bmp2; Cyp26A1;* y *MyoD*; por lo que hemos decidido hacer una revisión de sus patrones de expresión por "*hibridación in situ*" en el embrión de pollo.

Los objetivos en este trabajo serán revisar los patrones de expresión de dichos factores clave, conjuntamente con una revisión de la bibliografía con respecto a la función de los mismos en la morfogénesis de los dedos. Por ello hemos analizado las siguientes cuestiones:

- El carácter condrogénico de *Sox9*, detallando su expresión como gen particular de la condrogénesis.
- El papel de Scleraxis en la fibrogénesis, concretamente con tendones y ligamentos, detallando su expresión como uno de los genes más tempranos en la especificación del tejido fibrogénico.
- La presencia de *Gdf5* en el proceso de formación de las articulaciones, descrito como un marcador estándar de la misma.
- El carácter miogénico de *MyoD* en el proceso de diferenciación tisular y sus patrones de expresión en el esbozo de la extremidad.
- La función del factor *Cyp26A1* en la muerte celular, principalmente en tejido interdigital y cuando tienen lugar los estadíos de regresión, así como su relación con el ácido retinoico.
- La responsabilidad de *BMP2* en la muerte celular, principalmente en el interdígito, ya que parece ser un factor promotor de la muerte celular. Además de su intervención en la maduración articular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo experimental

Para llevar a cabo los estudios necesarios para el presente Trabajo de Fin de Grado, se han empleado embriones de pollo obtenidos de huevos fecundados de gallina (*Gallus gallus*) de 4 a 8 días post-incubación (PI), equivalente a los estadíos 24 (24HH) y 34 (34HH) de Hamburguer y Hamilton (Hamburguer y Hamilton, 1951).

Los huevos se mantuvieron en incubación a 38.5ºC durante el número de días necesario para que se cumplieran los tiempos concretos de maduración cara a obtener el estadío del desarrollo del embrión considerado más apropiado para cada experimento.

El estudio ha sido realizado de acuerdo a las directrices de la Declaración de Helsinki, de acuerdo con la legislación española (RD53/2013) y con la autorización del gobierno local a través de su comité de ética (PI-03-18).

2. Tinciones

2.1 Tinción vital con Rojo Neutro

El rojo neutro es un colorante vital que vamos a utiliza en tejido vivo. El motivo de emplear en nuestros experimentos la tinción vital con Rojo Neutro es observar los patrones de muerte celular a lo largo del desarrollo de la extremidad.

El primer paso es disponer de una placa de Petri de 35 mm. con 2 ml de solución PBS (en nuestro caso lo hicimos así pero también puede ser un medio de cultivo), el segundo paso que llevamos a cabo es diluir en esta 100 μ l de Rojo Neutro al 0,2 %.

Una vez tenemos preparado nuestro campo, tomamos el huevo, sacamos al embrión con sumo cuidado y disecamos sus extremidades. Los miembros, tras ser disecados, serán sumergidos de manera concienzuda en la tinción y posteriormente se mantienen a 37°C durante 20-30 minutos en esta misma solución.

Iremos comprobando reiteradamente si las muestras se tiñen, hasta que la tinción adquiera la tonalidad deseada, que es el momento en que lavamos las piezas un par de veces en solución PBS, para posteriormente fijarlas en Formol/Cálcico a 4°C.

El último paso es deshidratar las muestras una vez hayan transcurrido 12 horas de proceso de fijación, en dos pases de una hora a 4°C en 2-Propanol y se transparentan los tejidos en Xilol a 4°C.

Para obtener imágenes como las que podemos encontrar en el apartado de la Introducción de este trabajo (figuras 1A y 1C), colocaremos las extremidades ya fijadas y transparentadas en una placa de Petri con PBS y sacaremos las fotos. Los "puntitos rojos" que se aprecian en el tejido indican muerte celular.

Las fotos las hacemos con una lupa estereoscópica (estereomicroscopio) con cámara incorporada, que nos aporta una calidad máxima. Las lupas estereoscópicas

usadas para observar las muestras suelen ser lupa ZEISS binocular Stemi 2000C que tienen unos cuernos con los que dirigir la luz fría hacia la placa para poder observar de la manera más rentable posible. La cámara incorporada a la lupa que hemos usado es una Nikon Digital Camera Dxm1200C o Nikon SMZ1500.

2.2 Tinción Azul Alcian para cartílago

Esta tinción la hemos empleado con el fin de analizar la condrogénesis producida en el período de desarrollo correspondiente al embrión de la pata en cuestión. Para ello el primer paso a realizar es fijar las patas en ácido tricloroacético (TCA) al 5% durante la noche a 4ºC, previamente habiendo sido bien lavadas en PBS dos veces por 5 minutos. En segundo lugar pasaremos las muestras a Alcian blue 1%, donde quedarán sumergidas a temperatura ambiente mínimo 24 horas, ya que podemos dejarlas incluso 2-3 días.

Una vez superados los pasos previos, realizamos dos lavados de 30 minutos cada uno con alcohol ácido (100 ml de etanol 70% y 1 ml de HCL 1N). Seguidamente haremos dos lavados de una hora cada uno con alcohol 100% para a continuación introducir las extremidades en metil-salicilato.

Finalmente las muestras son transparentados con una mezcla de Glicerol y PBS 1:1

Esta técnica es la que ha sido empleada para obtener imágenes como las que podemos encontrar en el apartado de la Introducción de este trabajo (figuras 1B y 1D).

3. Hibridación in situ en miembros de embriones

La hibridización *in situ* es una técnica que nos permite detectar por complementariedad secuencias específicas de ácidos nucleicos y por tanto material genético y genes, en cortes tisulares, células o cromosomas morfológicamente preservados (Boehringer M. Biochemica, 1992; Cunningham, 2002).

Mediante la hibridación in situ en este trabajo hemos analizado la expresión de los siguientes genes en las extremidades de embriones de pollo: *Sox 9* (marcador del inicio de diferenciación condrogénica), *Scleraxis* (marcador temprano de diferenciación fibrogénica), *Gdf5* (marcador de articulaciones sinoviales durante la formación de los dedos), *MyoD* (marcador de los precursores musculares durante el desarrollo de la extremidad), *Cyp26A1* (marcador de las regiones de muerte interdigital durante los estadios de regresión), *BMP2* (su expresión durante la muerte interdigital y en la maduración de las articulaciones de los dedos). Las sondas de hibridación proceden de secuencias de estos genes que fueron clonadas previamente al inicio de este trabajo por técnicas de PCR y son de uso habitual en el laboratorio.

Los ensayos de hibridación in situ correspondientes a este texto han sido llevados a cabo para examinar la expresión de los genes previamente mencionados, en función de la aparición de sus transcritos de RNA en el interior celular. Las pruebas de hibridación in situ han sido realizadas con sondas anti-sentido de RNA sobre las extremidades de nuestros embriones de pollo. El protocolo que hemos seguido en la realización de los experimentos será detallado de manera exhaustiva en las próximas líneas. Este es un proceso a realizar cautelosamente y con precaución, ya que aunque no todos los pasos han de ser llevados a cabo con sumo cuidado por sus distintas relevancias en el resultado visual posterior en las imágenes, otros muchos pasos han de ser reproducidos exactamente como se indica en los manuales.

Durante la hibridación *in situ*, los siguientes factores pueden establecer un cambio muy significativo y/o la diferencia entre un buen o mal resultado en las imágenes que queremos obtener: pequeñas variaciones en la manipulación tanto de las muestras de tejido como de las soluciones, diluciones, fijadores, tampones, sondas... así como las temperaturas a las que exponemos a nuestros materiales y durante cuanto tiempo lo hacemos (pudiendo ser este insuficiente o por el contrario excesivo para las reacciones necesarias a tener lugar, así como para nuestro objetivo de visualización).

La manera de redactar en este texto la elaboración de los numerosos experimentos de hibridación *in situ* que han sido llevados a cabo para este trabajo va a ser con una distribución en días, tal y como lo hemos ido haciendo en la práctica, para poder plasmar mejor la duración de los mismos, así como la manera que hemos tenido de desenvolvernos en cada uno de los pasos del protocolo.

Primer día de Hibridación in situ

Cabe explicar que los huevos que vamos a utilizar están incubándose a 38,5°C dentro de una cámara caliente sobre un soporte donde están colocados, seguros, y que se mueve cada 30 minutos realizando giros de unos 45° alternando a izquierda y derecha. En el momento en que vayamos a sacar huevos para proceder a sacrificar los embriones lo que debemos hacer es lo primero parar el volteo, cambiar la posición en que estén en ese momento expuestos y colocar la plataforma de la cámara en horizontal con los huevos en posición vertical y con su polo romo mirando hacia arriba. Posteriormente estarán una hora enfriándose antes de comenzar con el procedimiento.

El inicio de todo el proceso se sitúa en el momento en que sacrificamos al embrión y lo sacamos del huevo, debemos hacerlo con cuidado de no dañar la pieza, nos resulta más sencillo con dos utensilios, una pinza para agarrar y otro para sujetar, así nos aseguramos de no estropear las extremidades que es lo que nos va a resultar realmente de utilidad. Entonces pasamos a eliminar las membranas y demás tejidos que no son de interés para nuestro ensayo, sacrificamos por decapitación al embrión y disecamos las extremidades de este, para seguidamente lavarlas en un buffer, que es PBS frío.

A continuación, se fijan los tejidos en paraformaldehído (PFA) fresco al 4% en PBS, pueden dejarse desde 6 horas a toda la noche (nosotros lo dejamos hasta el día siguiente) a 4°C en la nevera.

Segundo día de Hibridación in situ

El período de fijación es el paso previo, correspondiente con el día 1 del experimento, y tras este procedemos realizando primero dos lavados en PBS salino (de 5 minutos cada uno), después un lavado con PBT frio de 5 minutos, eliminando así los restos de paraformaldehído. El PBT es una mezcla de PBS y "Tween 20", este último es un detergente de textura gel que lo que hace es permeabilizar el tejido en el que se impregna.

A continuación, siempre en frío y concretamente a una temperatura de 4°C, se deshidratan los tejidos en pasos crecientes de metanol en PBT, es decir, que vamos lavando las extremidades con unas soluciones que contienen metanol y PBT diluidos, pero aumentando progresivamente la proporción de metanol en la mezcla respecto a la de PBT. Explicado de otro modo, hicimos un lavado de 5 minutos con 25%ME/75%PBT, otro lavado de 5 minutos con 50%ME/50%PBT, otro lavado de 5 minutos con 75%ME/25%PBT y por último dos lavados de 5 minutos con 100 %ME.

Una vez en metanol 100%, las piezas pueden ser guardadas en el congelador a -20°C. Aunque no se quieran guardar las muestras, es necesario pasarlas por metanol al menos durante 2 horas.

Tercer día de Hibridación *in situ* – Primer día de prehibridación

Para continuar donde lo dejamos con el paso anterior (habíamos deshidratado las extremidades del embrión con metanol), aplicamos un proceso inverso al previo, y lo hacemos rehidratando los tejidos nuevamente hasta llegar a una cantidad de PBT 100% partiendo desde el metanol 100% en que los habíamos dejado: (100-75-50-25% MeOH/PBT 2xPBT).

Más concretamente, el modo de proceder es lavar los tejidos 5 minutos con 100%ME, luego un lavado de 5 minutos con 75%ME/25%PBT, otro lavado de 5 minutos con 50%ME/50%PBT, otro lavado de 5 minutos con 25%ME/75%PBT y finalmente dos lavados de 5 minutos cada uno con 100%PBT.

Seguidamente aplicamos un producto blanqueante, que es H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) al 6% en PBT, que hemos mantenido guardado en la oscuridad durante 1 hora (aunque puede ser desde 30 minutos hasta 1 hora). Seguidamente se lava de nuevo, esta vez tres turnos de PBT, durante 10 minutos cada uno de ellos.

Una vez acabados los lavados, procedemos a tratar los tejidos con proteinasa K (pK) 10µg./ml. en PBT a 19-20ªC.

Con el fin de conseguir desenmascarar las secuencias de mRNA de interés para nosotros, usamos la proteinasa K (pK) en nuestro experimento, es un paso por tanto con mucha relevancia. Este compuesto es un tipo de enzima proteolítica que usamos para pretratar el tejido, de manera que se permeabilizan las células y se exponen las secuencias de interés, facilitando de esta forma el acceso de la sonda marcada que usaremos posteriormente. La sonda de RNA antisentido recién mencionada, se ha sintetizado utilizando una fuente de bases donde el uracilo esta modificado químicamente asociado específicamente a una molécula de digoxigenina. Este marcaje de la sonda se realiza para detectar la hibridación de la misma con su secuencia diana en el tejido, que sería el material genético de interés en nuestros tejidos. De tal modo, el marcaje de nuestra sonda es de tipo indirecto, mediante digoxigenina, la cual se encuentra de manera exclusiva en las flores y hojas de las plantas digitalis. Con posterioridad, utilizaremos un anticuerpo específico antidigoxigenina que añadiremos disuelto en un suero, una vez estemos ya en el período de posthibridación. Estos anticuerpos están conjugados a la enzima fosfatasa alcalina y presentan una muy elevada afinidad por el esteroide en cuestión, la digoxigenina, y así conseguimos una adecuada detección de dónde ha hibridado la sonda.

Continuando con el concepto de "digestión de la pK" comento lo siguiente en relación a los experimentos:

También al inicio de este apartado hacíamos alusión a la suma importancia de los tiempos de tratamiento de los tejidos en estos experimentos y de cómo estos variarán en función de la muestra que estemos procesando y del gen que queramos observar su expresión. Pues bien, puesto que hemos realizado hibridaciones *in situ* siempre con el mismo tejido (las extremidades de los embriones) pero el objetivo final de visualización en cada uno de los experimentos era diferente (en ocasiones el gen *Sox9*, en otros casos *BMP2*, *MyoD*...) el tiempo de la pK no ha sido siempre el mismo, necesitando en algunas situaciones un tiempo más largo que en otras. En rasgos generales estos tiempos han oscilado entre los 19 y 24 minutos aproximadamente. También nos ha ocurrido que en ciertos experimentos no habíamos obtenido un resultado adecuado, en el que no visualizábamos correctamente la expresión de los genes, y por ello al repetirlo, dejamos más tiempo la pK, hasta que obtuvimos los resultados esperados, que son los que se muestran en los "resultados y discusión".

Por ejemplo en el caso de los ensayos con extremidades de 5, 6, 7 y 7.5 días de incubación, para valorar *MYOD y BMP2*, encontramos el tiempo adecuado de pK en 24 minutos. Previamente habíamos hecho un ensayo con extremidades de 7, 7.5 y 8 días con un tiempo de digestión de la pK de 22 minutos, para analizar la expresión de estos mismos genes, sin obtener un buen resultado y por tanto concluyendo que habíamos optado por darle demasiados pocos minutos a la reacción de la pK en este paso.

Posteriormente la reacción de la pK se bloquea por la adición de glicina 2mg./ml. en PBT fresca; luego esta glicina se lava con dos pasos en PBT durante cinco minutos.

A continuación, se realiza un paso de refijación a 4 ªC durante 20 minutos con glutaraldehído y paraformaldehído (PFA). La mezcla teórica es 4%PFA + 0,2% glutaraldehído.

Una vez hecha la segunda fijación con PFA/glutaraldehído de nuestro proceso, volvemos a lavar dos veces en PBT durante 5 minutos, hasta retirarlo finalmente.

Ya llegando al final de la etapa de prehibridación, debemos precalentar la sonda (elaborada por nosotros en el laboratorio) con el buffer de hibridación durante 1 hora a 65ªC para que funcione correctamente. De tal modo, para terminar con esta fase de "prehibridación", lo que hacemos es efectivamente hibridar durante toda la noche y hasta el día siguiente, en baño seco y a 67ªC, recomendable incluso en agitación suave, habiendo agregado previamente la sonda correspondiente que está disuelta en una solución de prehibridación.

Cuarto día de Hibridación in situ – Primer día de posthibridación

A partir de ahora, las explicaciones que se den hacen referencia al período de posthibridación, es decir una vez superada la fase en la que la sonda antisentido de RNA que hemos colocado hibrida con nuestras muestras.

El paso a realizar en este punto es de nuevo lavar las muestras, en este caso lo haremos 2 veces con solución 1 durante 1 hora cada una de ellas y a una temperatura de 65 °C. Posteriormente toca hacer un lavado con solución 3 de 10 minutos a temperatura ambiente y después otro lavado con solución 3 de 30 minutos a 65°C. el siguiente lavado.

El levamisol es una sustancia que actúa como inhibidor de la fosfatasa alcalina endógena tisular, un enzima que puede complicarnos un poco el emparejamiento de la sonda con el material genético de los tejidos, y así al mantenerse inhibida la enzima, se facilita la entrada de la sonda en el tejido. Teniendo esto en cuenta entendemos el siguiente paso, que consiste en realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con una solución de TBST2mM Levamisol; así lo que hacemos es iniciar el bloqueo de reacciones inespecíficas con 1% de reactivo bloqueante (que es el levamisol) en TBS. Seguidamente se tratan los tejidos a temperatura ambiente con una solución de bloqueo durante 60-90 minutos, esta está compuesta por 1% reactivo bloqueante (levamisol) y 10% suero de cordero en TBST.

A continuación (sin incluir los tejidos en este paso) lo que hicimos fue tratar únicamente la antidigoxigenina con la misma solución previa de suero de cordero al 10%, en una dilución 1/2000 antig/10% lamb serum; dejamos así el anticuerpo durante un intervalo de 60-90 minutos a 4 °C y en agitación. El suero lo que hace es bloquear las uniones inespecíficas.

Para finalizar añadimos a las extremidades de los embriones la solución con el anticuerpo y permitimos que tenga lugar la incubación de los tejidos con el anticuerpo; esto se puede hacer durante 4h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, siendo esta última opción por la que nos decantamos nosotros.

Quinto día de Hibridación in situ – Segundo día de posthibridación

En este punto del experimento tras haber tenido ya lugar la reacción antígenoanticuerpo lo que hacemos es lavar bien los tejidos para eliminar todo lo que no haya sido reconocido por complementariedad en la hibridación, y por tanto significa que no va a aportarnos información en el análisis de nuestros resultados.

La manera de proceder es practicar 4-5 lavados de 40 minutos de TBST 2mM levamisol a temperatura ambiente. Por último se dejan los tejidos de 1 hora a toda la noche en NTMT a 4°C. Después, y para finalizar con los lavados, haremos dos más de 15 minutos en este caso con NTMT a temperatura ambiente y tras ello, se agrega solución de revelado que puede mantenerse desde 1h. a toda la noche y es muy importante que sea en la oscuridad (nosotros lo mantuvimos durante la noche). Utilizamos una cantidad aceptable de producto de revelado para que tape bien los tejidos (unos 3 mm), este es una solución comercial de revelado ya lista para su uso, llamada BM Purple Roche. Cat. Nº 1442074. También cabía la posibilidad de usar una solución de NTMT con 2% NBT/BCIP (Roche. Cat. N° 1681451) en reacción reversible, cosa que no hicimos puesto que aparentemente aparece menos tinción de fondo o borramiento con el BM Purple que con el NBT/BCIP, y tal y como lo hemos hecho además no hay pérdida de sensibilidad en el reconocimiento.

En cuanto al BM Purple este es un producto que se define como "sustrato cromogénico para fosfatasa alcalina" y está diseñado para inmunoensayos de precipitación de enzimas; la conservación del mismo requiere imprescindiblemente una temperatura de almacenamiento de 2-8°C. El color de la solución antes de su uso es amarillo claro pero con la reacción pasa a tener su característico color morado oscuro; tanto el producto como la reacción son insolubles en agua. Su manera de funcionar es desarrollando una banda o "mancha" permanente de color morado oscuro en el sitio de unión de la fosfatasa alcalina. Esta zona coloreada en púrpura que vemos en nuestro tejido son aquellas células en las que se ha precipitado un nuevo producto insoluble, formado como consecuencia de la reacción entre la fosfatasa alcalina con estos sustratos cromogénicos recién añadidos del BM Purple. Pero lo que resulta interesante y al final es la clave del análisis que realizamos en nuestro trabajo es que únicamente quedarán coloreadas aquellas zonas que expresan el RNA específico que ha hibridado con la sonda inicial utilizada, pues es donde se ha fijado el anticuerpo antidigoxigenina.

La reacción es revisada periódicamente bajo la lupa, y cuando es la deseada se para con PBT. Se realizan varios lavados de 5 minutos con PBS y finalmente se pasan las muestras a glicerol 50% en PBT guardándose a 4°C hasta su fotografiado.

4. Fijadores, soluciones y tampones utilizados

BUFFER DE HIBDRIDACIÓN (10 ml.):

50% Formamida (5 ml. 100% stock) + 5XSSC (2,5 ml. 20XSSC pH7) + SDS1% (1 ml. al 10%) + 50 microgr/ml tRNA (50 microl.) + 50 microgr/ml Heparina (10 microl.).

FIJADOR GLUTARALDEHÍDO (100 ml.):

12 ml. de glutaraldehído al 25% + 88 ml. de tampón cacodilato.

FIJADOR PARAFORMALDEHÍDO al 4%:

Disolver 4 g. de paraformaldehído en polvo en 100 ml. de PBS y después calentar esta solución a 60°C y mover hasta que el medio se transparente. Posteriormente enfriarlo a 4°C en la nevera. Añadir 25 mM. EDTA pH 8,0.

NTMT (100 ml.):

Tris HCl 1M ph 9,5 (10ml.) + MgCl2 1M (5ml.) + NaCl 5M (2 ml.) + Tween 20 10% (1ml.) + Levamisol 200mM (0,5 ml.) + H20 (81,5ml.)

PBT:

Tween 20 0,1% (500 microl.) en 1xPBS (495 ml.).

SOLUCIÓN DE AZUL ALCIÁN AL 1%:

Pesar 1g de Azul Alcian y disolverlo en 100 ml. de HCl 0,1N. Después agitar bien y filtrar la solución con papel de filtro.

SOLUCIÓN DE RINGER:

120 mM. NaCl + 5,6 mM. KCl + 2,16 mM. CaCl2

SOLUCIÓN DE ROJO NEUTRO al 0,2%:

Disolver 0,2g de Rojo Neutro (Certistain, ref. 746K1378776) en 100 ml. de Ringer. Después agitar bien y filtrar la solución con papel de filtro.

SOLUCIÓN 1 (volumen: 200 ml.):

Formamida 100ml. + SSC20X ph 4.5 40 ml. + SDS 10% 20 ml. + H20 40 ml

SOLUCIÓN 3 (volumen: 200 ml.):

Formamida 100ml. + SSC20X ph 4.5 20 ml. + H20 80 ml

TBST (500 ml.):

50 mM Tris HCl ph 7,5 1M (25ml.) + 15 mM NaCl 5M (15 ml.) + 10 mM KCl 1M (5 ml.) + 1% Triton 100& (5ml.) + 2mM Levamisol 200mM (5 ml.) + H20 (445ml.)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sox9 como marcador del inicio de la diferenciación condrogénica.

Sox9 codifica para un factor de transcripción, perteneciente a una familia que presenta la secuencia conocida como SRY-related box (Sox), donde sus miembros comparten un dominio conservado del grupo de alta movilidad (dominio HMG, del inglés High Mobility Group) que se une al ADN en regiones específicas, modificando su conformación tridimensional y ayudando a controlar la actividad de genes concretos. Las proteínas del dominio HMG son únicas en su capacidad para modificar la conformación del ADN e incrementando enormemente la accesibilidad a otros factores que puedan modular la expresión génica. Actúan como potenciadores, facilitando la formación de complejos activos de factores de transcripción en secuencias potenciadoras de genes diana. Esta habilidad ha favorecido que los factores de transcripción SOX se caractericen en el reino animal, por ser factores que ayudan a las células a tomar decisiones que le hagan abandonar su estado de indiferenciación (ver Lefebvre et al., 2007).

Entre otras potenciales funciones de *Sox9*, la expresión de este factor es el primer signo de compromiso con el destino condrogénico de células mesenquimales embrionarias indiferenciadas. Las severas alteraciones esqueléticas que caracterizan la displasia campomélica, aparecen característicamente con la haploinsuficiencia de *Sox9* (Wagner et al., 1994). Sox9 es un factor que interviene en el proceso de agregación precondrogénica, paso inicial de la osificación endocondral, y, de hecho, se ha mostrado que la pérdida de la expresión de *Sox9* da lugar a la ausencia total de agregados precondrogénicos en el esqueleto de las extremidades en desarrollo (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002). Adicionalmente se ha visto que ejerce un papel fundamental en regular la producción de la matriz extracelular característica del cartílago, con abundancia de proteínas como el Colágeno II o el Agrecano (Bi et al., 1999).

Con respecto a la formación de los dedos, *Sox9* es un factor de respuesta rápida a la acción de los factores secretados responsable de la inducción condrogénica, tales como Activinas, TGF β s o BMPs (Chimal-Monroy et al., 2003; Montero et al., 2008). En concordancia con esto en el ratón mutante con un exceso de expresión de *Sox9* en el autopodio en desarrollo, se produce un fenotipo caracterizado por la polidactilia (Akiyama et al., 2006).

Finalmente se ha mostrado que la expresión de *Sox9* salva a las células mesenquimáticas indiferenciadas del destino apoptótico y promueve su entrada en la ruta condrogénica, pues la ausencia de expresión de este factor causa la muerte masiva de las células del autopodio y la truncación de sus dedos (Akiyama et al., 2002; Chimal-Monroy et al., 2003). De hecho, se ha demostrado que la expresión de *Sox9* es más intensa en el tejido interdigital del autopodio en desarrollo de especies con dedos palmeados, que en el de especies con dedos libres (Montero et al., 2017).

En un esbozo de la extremidad inferior en etapas iniciales, como el estadio HH24 que se muestra en la figura 2 A-B, aparece un territorio de expresión distal y otro

proximal. En la región proximal se distinguen dos dominios de expresión precoz de *Sox9*, una franja posterior que ha sido descrita como un eje primario de donde derivará el fémur y la fíbula o peroné, y una franja anterior especificando el mesénquima que formará la tibia (figuras 2A-B). Finalmente aparece un dominio distal en forma de arco naciente que ocupa una posición posterior y distal donde se está especificando en mesénquima que participará en la formación de los dedos (figura 2A-B).

Inicialmente, la expresión es uniforme y limitada a la mitad posterior del autopodio (Montero et al., 2017), pero en las siguientes etapas (figura 2C-D), la expresión se expande en sentido anterior, y los dedos aparecen identificables como dominios de expresión intensa (ver figura 2C para estadio HH27 y figura 2D para estadio HH28).

Los dedos 3 y 4 son los más prominentes en estas etapas mientras que los dígitos 2 y 1 son áreas mal definidas donde la expresión de *Sox9* es inicialmente difusa y no muy intensa (ver diferencias entre dedos 1 y 2 y 3 y 4 en figuras 2C-D).

En estadios más tardíos, la expresión de *Sox9* desaparece de los dedos en las regiones donde se está produciendo la maduración hipertrófica del condrocito y la formación de las articulaciones (ver dedos en figura 2E correspondiente a un autopodio de estadio HH 31). En estos estadios y con posterioridad, la expresión se mantiene especialmente intensa en la punta de los dedos (figura 2E-F), donde la agregación precondrogénica de las células que acaban de abandonar la zona de progreso se mantiene, permitiendo el crecimiento y elongación de los dedos en desarrollo (ver Montero et al., 2008).



Figura 2. Expresión de Sox9 en la extremidad del embrión de pollo por hibridación in situ. (A-B) Embrión de estadio HH24 donde en A se muestra una visión dorsal de la mitad caudal del embrión y en B un detalle de la extremidad inferior. En ambas imágenes se puede apreciar expresión de *Sox9* en los somites del tronco. Con respecto a las extremidades, se aprecian dos territorios de expresión: uno distal en forma de arco naciente, en el mesénquima que dará lugar a los dedos; y otro proximal, con dos dominios de expresión precoz de sox9, que darán lugar a la formación de la fíbula y la tibia. **(C-D)** Extremidad de estadío HH27 (C) y HH28 (D) donde podemos apreciar que la expresión de *Sox9* aparece como un marcador temprano de la formación de los dedos. **(E-F)** Conforme avanza el desarrollo la expresión de Sox9 se mantiene especialmente intensa en la punta de los dedos, mientras que va desapareciendo de las regiones donde el cartílago digital avanza en su maduración. En la figura E podemos un autopodio de estadio HH 31 y en la F de estadio HH 33. En las figuras B, C y D distal está hacia la derecha y anterior hacia arriba en la imagen. En las figuras E y F distal esta hacia arriba y anterior hacia la izquierda. En B-F las imágenes son una visión dorsal de la extremidad.

Scleraxis, un marcador temprano de diferenciación fibrogénica.

Scleraxis (Sclx), es un factor de transcripción de la familia bHLH (del inglés basic Helix-Loop-Helix), que ha sido descrito como un marcador altamente específico y temprano de los precursores del tejido conectivo denso durante el desarrollo. Esto incluye tanto los tendones como los ligamentos. La expresión y función de *Sclx* ha sido muy estudiada durante el desarrollo de la extremidad. Así la expresión de *Scleraxis* es detectada de manera sostenida en los precursores de estos tejidos en el esbozo inicial de la extremidad, manteniéndose hasta estadios posteriores donde se produce la maduración de los tendones (Schweitzer et al., 2001). Esto convierte a *Scleraxis* en un marcador de la población de sus progenitores, y de los tendones en sí, en la extremidad.

Sin embargo, su papel en la formación de tendones aún no se ha comprendido por completo. En los ratones KO para *Sclx*, los tendones largos se ven severamente afectados, pero, sin embargo, gran cantidad de tendones cortos de la extremidad se forman normalmente. Esto sugiere que la elongación de los tendones, basada en la agregación de sus precursores, se ve afectada por la carencia de *Sclx*, no la especificación de los precursores en sí (Murchison et al, 2007; Huang et al., 2019). Sin embargo, *Sclx* también promueve la maduración de los tendones, así se ha mostrado que es clave modulando la expresión y organización de componentes clave de su matriz extracelular (Murchison et al, 2007; Léjard et al., 2007).

En la extremidad, los tendones distales de los dedos tienen un patrón de formación que difiere del patrón de formación de los tendones proximales. En el embrión de pollo, la formación de los tendones distales de los dedos está precedida por la organización de una lámina mesenquimática de progenitores asociados a un andamiaje de matriz extracelular, que aparece entorno al estadio HH27 en estrecha asociación con el ectodermo suprayacente, y, en concreto, con su membrana basal. A partir de aquí, un sistema fibrilar complejo se extiende en una orientación dorsoventral y sirve como andamiaje para los tendones en formación. Estos se elongan distalmente conforme los dedos van creciendo y su morfogénesis está estrechamente coordinada con la de los elementos esqueléticos de los dedos en formación (Hurlé et al., 1989; 1990).

La morfogénesis de los tendones proximales de las extremidades difiere significativamente de la de los tendones distales (Kardon, 1998). Aquí no aparece la formación de una lámina mesenquimática y el blastema del tendón, derivado de los precursores mesenquimáticos del esbozo de la extremidad, aunque en su especificación no depende de la presencia de mioblastos, se desarrolla en estrecha asociación con los precursores musculares que penetran en dicho esbozo (Kardon, 1998; Schweitzer et al., 2001). A pesar de ello, si los tendones distales de los dedos, que se pueden formar independientemente del desarrollo del músculo, no se acaban asociando a un vientre muscular, acabarán degenerando (Kieny y Chevallier, 1979; Rodríguez-Guzmán et al., 2007).

En nuestros ensayos de hibridación *in situ*, tal como se ha descrito y cabe esperar, hemos detectado la expresión de *Scleraxis* en dos dominios durante el desarrollo de la extremidad, uno dorsal (figuras 3A,B,C,D,E y F) y otro ventral (figura 3A,B',C',D',E' y F'). En la extremidad en desarrollo del estadio HH25, aparece un domino compacto dorsal (figura 3B) y otro ventral (figura 3B') en el mesodermo del esbozo.

Conforme avanza el desarrollo y van penetrando los precursores del músculo en el esbozo, aparece en ambos dominios una región central libre de marcaje y un dominio arqueado de convexidad distal (ver estadio HH26 en figura 3C-C´). La región ausente de marcaje intenso en la zona central del esbozo corresponde a la zona invadida por precursores musculares (ver Schweitzer et al., 2001), mientras que en la zona más distal se observa un marcaje intenso a la altura de donde establecerán las uniones miotendinosas entre los vientres musculares y los tendones de los dedos (figura 3C-C´; ver Rodríguez-Guzmán et al., 2007).

Entre los estadios HH27 y HH29 (figura 3D-D´y 3E-E´), donde comienzan a especificarse en el mesodermo los agregados que formarán los radios digitales, *Sclx* se expresa en bandas anchas tanto en el mesénquima de la región dorsal (figura 3D y 3E) como en el de la región ventral (figura 3D´ y 3 E´). Estas bandas de mesénquima positivas para *Sclx* se especifican entre los agregados precondrogénicos digitales y el ectodermo superficial (ver Schweitzer et al., 2001). Conforme avanza el desarrollo estos dominios se expanden distalmente, acompañando el crecimiento de los dedos (comparar dominios en figura 3D-D´ con los mismos en figura 3E-E´).

Finalmente, conforme van madurando los precursores fibrogénicos para formar los tendones definitivos, estos van adquiriendo una conformación más estrecha en proporción a los dedos correspondientes, manteniendo una expresión intensa de *Sclx*, como perfecto marcador de estos tendones (estadio HH34 en figura 3F-F[']).



Figura 3. Expresión de *Scleraxis* **en relación a la diferenciación fibrogénica temprana. (A)** Visión del dorso de la mitad caudal de un embrión de estadio HH25 donde se puede apreciar la expresión de *Scx* en los somites. **(B-F)** Visiones dorsales y **(B'-F')** visiones ventrales de la extremidad derecha en distintos estadios. Las figuras B y B' son un esbozo inicial (estadio HH25) en el que se presenta un dominio de expresión de *Scleraxis* compacto en el mesodermo. En las figuras C y C' (estadío HH28) a la par que avanza el desarrollo aparece una región central sin expresión y además observamos una zona distal de expresión fuerte (lo que serán las uniones miotendinosas). Vemos bandas anchas en el mesénquima, que formarán los radios digitales en figura D-D' (estadio HH27) y también y más expandido distalmente en figura E-E' (estadio HH29). En la figura F-F' (estadio HH34) vemos perfectamente definida la expresión de *Sclx* asimilándose más a la forma de los tendones definitivos. En las figuras B y B' distal es hacia la derecha y la izquierda respectivamente. En las figuras C-F' distal es hacia arriba.

Gdf5 un marcador de articulaciones sinoviales durante la formación de los dedos.

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs del inglés Bone Morphogentic Proteins), junto con los factores de crecimiento transformante beta (TGF β del inglés Transforming Growth Factor beta), Nodal y las Activinas/Inhibinas constituyen la superfamilia TGF β de ligandos. El más amplio en número de miembros (entorno a 20) es la subfamilia BMP que comprende tanto las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), como los factores de crecimiento y diferenciación (GDF del inglés Growth and Differentiation Factor). Pueden actuar como homodímeros o heterodímeros y con amplia promiscuidad con respecto a sus receptores, donde transmiten su señal a través del reconocimiento de dos receptores diferentes formando un complejo heterotetramérico.

Los receptores conocidos como receptores de tipo I y tipo II, poseen actividad serina/treonina y tirosina quinasa y normalmente transmiten su señal a través de proteínas segundo mensajeros conocidas como proteínas SMAD (Mueller y Nickel 2012). Aunque inicialmente las proteínas BMP fueron descubiertas como factores capaces de inducir la formación de hueso (de ahí su denominación), con el descubrimiento de nuevos miembros y el avance en el estudio de sus funciones, se ha revelado que el potencial inductor de hueso es variable entre sus distintos miembros y que además están involucradas en infinidad de otros procesos tanto a nivel de desarrollo embrionario, como en regeneración de tejidos y cáncer (Grafe et al., 2018; Jia y Meng 2021; Ehata y Miyazono, 2022)

En este apartado nos hemos interesado por Gdf5, un factor con demostrada participación en la formación de las articulaciones (Storm y Kingsley, 1996; Merino et al., 1999b). *Gdf5* es uno de los factores más temprano que se expresan en las articulaciones en formación y la carencia del mismo durante el desarrollo da lugar a la formación de extremidades con alteraciones en los elementos esqueléticos de los dedos y la ausencia de algunas articulaciones (Storm y Kingsley, 1996; Merino et al., 1999b).

En el desarrollo, durante la formación de una articulación entre dos rudimentos cartilaginosos, es necesario un primer paso de especificación de una interzona entre ambos, donde en un segundo paso debe ocurrir un proceso de cavitación. Aún no está claro si esta región intermedia se forma una vez el rudimento cartilaginoso está especificado, revertiéndose esta especificación en la interzona, o si los rudimentos cartilaginosos se forman secuencialmente, dejando una interzona indiferenciada entre los rudimentos. Otro proceso que aún está por aclarar es el mecanismo de cavitación y si la muerte celular tiene algún papel o, como parece ser, no lo tiene en el mismo (Mitrovic D, 1978; Ito y Kida, 2000).

Analizando la expresión de *Gdf5* por hibridación *in situ* en la extremidad del embrión de pollo, hemos encontrado una intensa expresión de este factor a nivel de las regiones donde se establecen articulaciones. Así en la figura 4A aparece una extremidad inferior de un embrión de estadio HH26, donde se aprecia una intensa expresión proximal a nivel de donde se establecerán las articulaciones entre el estilopodio y el zeugopodio. Igualmente se detectan a modo de franjas de expresión las regiones de articulación entre el zeugopodio.

Finalmente, en la formación de los dedos, vemos la aparición de franjas distales de expresión en disposición transversal entre los metatarsianos en especificación (dedo 3 y dedo 4 en figura 4A) y las primeras falanges. Estas franjas transversales marcan las interzonas que se están estableciendo entre los rudimentos cartilaginosos.

Conforme avanza el desarrollo, podemos apreciar que estas franjas transversales de expresión se intensifican entre las falanges de los dedos en formación (figuras 4B-D). Es interesante resaltar, que en el momento de la especificación de la última falange, se establece un dominio de expresión de *Gdf5* en la punta de los dedos (ver autopodio de estadio HH32 en figura 4E). Además, en estos estadios más avanzados, donde las articulaciones han progresado ya a procesos de maduración, la expresión de *Gdf5* va adquiriendo una conformación que recuerda a la letra H, inhibiéndose en la interlínea articular, e intensificándose en los márgenes laterales de la articulación interfalángica (figura 4E; ver Merino et al., 1999b).



Figura 4. Expresión de Gdf5 como marcador de las articulaciones sinoviales en el desarrollo de los dedos. La figura A (estadio HH26) es una extremidad inferior derecha donde se aprecia la expresión de *Gdf5* en zonas proximales, donde posteriormente se formarán las articulaciones entre el estilopodio y el zeugopodio y entre el zeugopodio y el autopodio); también se ven franjas transversales en el auotpodio, en los dedos 3 y 4. (B-D) Las zonas de tinción, estas franjas transversales, progresivamente van haciéndose más intensas y definidas en zonas interfalángicas, con el avance del desarrollo del embrión como se aprecia en los estadios HH 27 (B), HH28 (C) y HH30 (D). La figura E se corresponde con un autopodio estadio HH32, donde además aparece intensa expresión de Gdf5 en la punta de la última falange. En las imágenes en A, B y C distal es hacia la derecha y anterior hacia arriba. En las figuras D y E, distal es hacia arriba y anterior hacia la izquierda. Todas son imágenes dorsales.

MyoD como marcador de los precursores musculares durante el desarrollo de la extremidad.

MyoD codifica para un factor de transcripción del grupo bHLH (basic Helix Loop Helix) perteneciente a la familia de factores reguladores miogénicos (MRFs, del inglés Myogenic regulatory factors), que además incluye Mrf4 (Myf6), Myogenin (MyoG) y Myf5 (Perry and Rudnick, 2000). Se ha visto que estos cuatro actores son responsables de promover la diferenciación miogénica desde el mesodermo embrionario. MyoD induce el compromiso hacia la diferenciación miogénica de las células indiferenciadas, y este es un papel que comparte con MRF4 y Myf5. Ante la ausencia de estos factores no se produce la miogénesis por falta de especificación de los precursores (Kassar-Duchossoy et al., 2004). Por otro lado, se ha visto que hay cierta redundancia funcional entre estos genes que hasta cierto punto son capaces de recuperar las alteraciones en el fenotipo ante la ausencia de alguno de ellos (Braun and Arnold, 1995; Kassar-Duchossoy et al., 2004; Sambasivan et al., 2009).

Finalmente, si *Myf5*, *Mrf4* y *MyoD* actúan como determinantes del compromiso miogénico de las células indiferenciadas (incluyendo la activación de las células satélites quiescentes, ante el daño muscular o en el ejercicio físico), *Myogenin* funciona como un factor de diferenciación esencial, madurando y manteniendo el fenotipo de los miocitos (Hasty et al., 1993, Nabeshima et al., 1993).

MyoD actúa en la diferenciación miogénica funcionando en forma de homodímeros o heterodímeros asociándose a los factores bHLH E12, E47 o ITF1 promoviendo la expresión de distintos genes miogénicos (Etzioni et al., 2005; Lluis et al., 2005). Durante el desarrollo de la extremidad los músculos no se especifican a partir del mesodermo del esbozo, sino que sus precursores migran desde el tronco y penetran en la extremidad en desarrollo. Lo hacen en forma de dos láminas de tejido, una dorsal y otra ventral en el esbozo de la extremidad, que posteriormente, conforme avanza el desarrollo, se van a ir reorganizando en los distintos vientres musculares flexores y extensores de la misma (Kardon, 1998). Estos procesos de reorganización de los músculos en la extremidad, depende de su interacción con los tendones en formación y se acompaña de procesos de muerte celular programada (Rodríguez-Guzmán et al., 2007).

Podemos seguir la evolución de la formación de los músculos en la extremidad mediante la técnica de hibridación *in situ*, utilizando como marcador la expresión del gen *MyoD*. Si analizamos las imágenes en la figura 5A y 5D podemos apreciar la mitad caudal de dos embriones de estadio HH22 y HH27 respectivamente vistos desde el dorso. Podemos apreciar en estos embriones la expresión de *MyoD* constituyendo dos láminas, una dorsal y otra ventral, en los esbozos de la extremidad. Estas láminas de tejido positivas para la expresión de *MyoD* pueden verse mejor en las figuras 5B y 5C, donde se muestra un detalle del esbozo de la extremidad derecha del embrión en la figura 5A, visto desde el dorso (5B) y desde su cara ventral (5C). De idéntica forma puede apreciarse la expresión de *MyoD* en una lámina dorsal (figura 5E) y otra ventral (figura 5F) de la extremidad derecha del embrión en la figura 5A y 5D, donde si se comparan ambas

imágenes puede apreciarse la reorganización de este tejido en los mismos durante el desarrollo (miotomo).

Como se aprecia en estadios más posteriores, como los de las imágenes de un autopodio de estadio HH30, desde su aspecto dorsal en la figura 5G y desde su aspecto ventral en la figura 5H, las laminas iniciales se van reorganizando en los distintos vientres musculares, en este caso músculos flexores y extensores intrínsecos de los dedos.

En estadios tardíos del desarrollo de los dedos (HH34) la independización y el desarrollo de los vientres musculares extensores (51) y flexores (5J) de los dedos en el autopodio es patente. En resumen, la hibridación *in situ* de *MyoD*, nos ha permitido seguir el desarrollo de los músculos asociados a los dedos desde sus estadios iniciales.



Figura 5. Expresión de MyoD como marcador de los precursores musculares durante el desarrollo de la extremidad. (A-D) Visión dorsal de la mitad caudal de dos embriones en estadio HH22 (A) y HH27 (B); la expresión de *MyoD* dibuja dos láminas en los esbozos de la extremidad. En ambas se aprecia expresión de *MyoD* en los somitas. En la figura B y en la figura C vemos un detalle de la extremidad derecha desde el dorso (B) y desde la región ventral (C), apreciando un mejor detalle de las láminas de expresión de *MyoD* en el estadio HH22; al igual que lo apreciamos en una extremidad de estadio HH27, en la figura E (visión dorsal) y en la figura F (visión ventral). **(G-J)** Autopodio en estadio HH30 con vista dorsal en G y vista ventral en H, que muestra la reorganización de láminas iniciales en grupos musculares de los dedos. En I y J se aprecia un autopodio en estadio HH34 mostrando la expresión en los vientres musculares extensores (I) y flexores (J) de los dedos. En las imágenes de la extremidad en B-F, anterior es hacia arriba y proximal a la izquierda. En las de G-J distal es hacia arriba, mientras que en G e I anterior es a la derecha y en H y J hacia la izquierda.

Cyp26A1 como marcador de las regiones de muerte interdigital durante los estadios de regresión

El ácido retinoico (AR), también conocido como retinol, es un metabolito hormonalmente activo de la vitamina A que presenta un papel importante en la regulación de la muerte celular interdigital, como factor promotor de la misma en coordinación con las proteínas morfogenéticas de hueso (Rodríguez-León et al., 1999). El retinol actúa a través de receptores nucleares específicos que son los receptores de ácido retinoico (RAR α , $\beta \gamma \gamma$) y los receptores X de retinoide (RXR α , $\beta \gamma \gamma$). Los receptores forman complejos heterodiméricos que cuando se unen a retinol son capaces de asociarse a regiones reguladoras de los promotores de genes diana favoreciendo su expresión (Petkovich, 1992). En el autopodio en desarrollo los niveles de los distintos retinoles se incrementan conforme avanzan y se desencadenan los procesos de muerte celular interdigital, y se ha visto que estos factores, no sólo modulan la muerte interdigital, sino que también, participan en los procesos de muerte celular que modulan la morfogénesis de los vientres musculares de los dedos (Rodríguez-Guzmán et al., 2007).

Como factores moduladores de la función de los retinoles encontramos unas enzimas metabolizadoras del AR, pertenecientes a la superfamilia del citocromo P450 conocidas como CYP26A1, B1 y C1 (familia 26A1, B1 y C1, respectivamente). Actúan como hidroxilasas del AR, impidiendo su correcta asociación con los receptores nucleares, restringiendo así su acceso a los genes diana y modulando de este modo la exposición de las células y los tejidos al AR (White et al, 1997; Abu-Abed et al. 2001; Taimi et al, 2003). Por otro lado, *Cyp26A1* ha sido propuesto como oncogen, ya que, en determinados tipos de cáncer, se ha visto que favorece la tumorigénesis, al reprimir la respuesta apoptótica modulada en algún modo por AR, favoreciendo la supervivencia celular (ver revisión de Osanai et al, 2023).

En nuestros resultados de hibridación *in situ*, la expresión que hemos encontrado en nuestro modelo de *Cyp26A1* es compatible con la regulación de los procesos de muerte celular programada. Presenta una interesante expresión en los estadios iniciales de la extremidad en la cresta ectodérmica apical (AER), donde como sabemos y se muestra en la figura 1A, hay una intensa muerte celular a lo largo de toda su longitud (Fernández-Terán et al., 2006). Como podemos apreciar en la figura 6A-B, donde se muestran los esbozos de extremidad de un embrión en estadio HH22, hay una intensa expresión de *Cyp26A1* a lo largo de toda la AER, que se dispone además de una manera curiosa en dos franjas, dibujando los márgenes de la misma.

Del mismo modo, durante el periodo de formación de los dedos, inicialmente hay una tenue expresión interdigital de *Cyp26A1* (figura 6C), que se va incrementando conforme avanzan los estadios de muerte interdigital (figura 6D-E). Con esta expresión, no es difícil especular con la posibilidad de que *Cyp26A1* este modulando la muerte celular en estas estructuras, donde se produce un delicado equilibrio entre los procesos de proliferación celular y muerte celular. De hecho, en estos estadios avanzados del desarrollo del autopodio, mientras inicialmente la expresión en la cresta ectodérmica apical se mantiene durante el estadio HH29 (figura 6C), comienza a desaparecer en los estadios en los que se inicia la regresión de la misma (ver figura 6D correspondiente a un estadio HH31), hasta no detectar expresión en la AER en los estadios de regresión más avanzada (ver figura 6E correspondiente a un estadio HH34).

El ratón Cyp26A1 presenta una severa truncación del eje próximo distal con la aparición de sirenomelia, aunque parece ser que la extremidad anterior se desarrolla con normalidad (Sakai et al., 2001). Sin embargo, esto no descarta la implicación de CYP26A1 en modular los niveles de AR en nuestro modelo y por consiguiente los procesos de muerte, ya que existen otras enzimas de esta familia que podrían amortiguar la ausencia de Cyp263A1 (Pennimpede el al., 2010). De hecho, Cyp26B1 presenta una expresión muy potente en la extremidad desde el principio del desarrollo de la extremidad y en los dedos en desarrollo, siendo muy importante en el crecimiento proximodistal de la misma (Pennimpede el al., 2010; Zhao et al., 2010). Es más, se ha propuesto que la intensa expresión de Cyp26B1 en los dedos Vs. interdígitos, elimina la acción apoptótica del AR en los dedos, restringiéndola al interdígito (Zhao et al., 2010). La principal enzima responsable de la producción de ácido retinoico, la Retinaldehido dehidrogenasa 2 (Raldh2), se expresa fuertemente en el interdígito (Zhao et al., 2010), donde la expresión de Cyp26A1 podría modular la disponibilidad de este metabolito en equilibrio con la acción *Raldh2*, y cooperar en conjunción con *Cyp26B1* para restringir y modular su acción apoptótica al interdígito.

Del mismo modo, *Cyp26A1* presenta dominios de expresión en el tejido peridigital (figura 6C-E), lo que junto con la expresión de *Cyp26B1* en el mesénquima digital, puede contribuir a restringir notablemente los niveles de AR en los dedos y el tejido conectivo peridigital, permitiendo su supervivencia y diferenciación en los tejidos característicos de estas estructuras (Zhao et al., 2010). De hecho, la inhibición local de la producción de AR en el interdígito, promueve la formación de un dedo ectópico adicional (Rodríguez-León et al., 1999).



Figura 6. Expresión de Cyp26A1 en el desarrollo de la extremidad del embrión como marcador de las regiones de muerte interdigital durante los estadios de regresión. (A y B) Esbozo inicial de extremidad del embrión en estadío HH22 con expresión de Cyp26A1 en la AER, delimitando sus márgenes laterales. En A se muestra el dorso de la extremidad superior derecha mientras en B se muestran ambos esbozos desde una vista ventral del embrión. **(C-E)** Expresión peridigital de *Cyp26A1* en un autopodio de estadio HH29 (C), HH31 (D) y HH34 (E). Inicialmente hay también una débil expresión interdigital de *Cyp26A1* (C), que va yendo a más con el desarrollo como se aprecia en los autopodios de estadios HH31 (D) y HH34 (E). Inversamente, la expresión de *Cyp26A1* en la AER que aun se mantiene en el estadio HH29 (C), ya en un estadío HH31 (D) comienza su regresión, hasta desaparecer en el estadío HH34 (E).

La expresión de *BMP2* durante la muerte interdigital y en la maduración de las articulaciones de los dedos.

La proteína morfogenética de hueso 2 (BMP2 por sus siglas en inglés) es otro miembro de la subfamilia de los factores BMP, integrada en la superfamilia de los Factores de Crecimiento Transformante Beta que describíamos arriba. Adicionalmente, la similitud en su secuencia, nos permite distinguir los BMPs de clase I (como BMP2 y BMP4) y BMPs de clase II (como BMP5, 6, 7 u 8). Es importante mencionar para entender el funcionamiento de estas citoquinas, que los factores BMP, pueden señalizar como homodímeros o heterodímeros. Se ha visto, que los heterodímeros compuestos por BMPs de clase I y clase II, promueven una actividad específica más alta que los homodímeros. Así, los homodímeros de BMP2, BMP4 o BMP7 pueden inducir la formación de hueso, pero los heterodímeros BMP2/7 o BMP4/7 son significativamente más potentes que cualquier homodímero en los ensayos de diferenciación osteogénica (Aono et al., 1995; Guo y Wu, 2012; Kaito et al., 2018). Este efecto más potente en heterodímeros BMP de Clasel/ClaseII se ha podido apreciar también en otros modelos como en la determinación dorso-ventral de los embriones de Xenopus (Schimd et al., 2000) o en estudios con células madre (Valera et al., 2010).

Los aspectos previos son muy importantes para nuestro modelo, porque en los momentos de inicio de la muerte celular interdigital, se ha mostrado que confluyen en el tejido interdigital las expresiones de, al menos, *BMP2*, *BMP4*, *BMP5* y *BMP7* (Gañan et al., 1996; Macías et al., Zuzarte-Luis et al., 2004).

Fue en 1996, cuando los grupos de los investigadores Juan Hurlé y Lee Niswander, descubrieron el papel de los BMPs como responsables de la inducción de la muerte celular interdigital en los embriones con dedos libres (Gañan et al., 1996; Zou and Niswander, 1996). No sólo se expresan de manera intensa en el tejido interdigital durante los procesos de inducción promoviendo la muerte celular, sino que, además, la inhibición de su función provoca la aparición de sindactilias. Así, si se bloquea la acción de los BMPs mediante la sobrexpresión en el tejido interdigital del embrión de pollo, de uno de sus antagonistas extracelulares como pueden ser las proteínas Nogina o Gremlin, se obtienen fenotipos de sindactilia membranosa, como si correspondieran a los dedos palmeados que podemos apreciar en el pato (Merino et al., 1999). De hecho, tanto en los embriones de pato, como del murciélago o del delfín, se detecta una fuerte expresión de *Gremlin* en el interdígito, lo que se correlaciona con sus fenotipos de dedos palmeados (Merino et al., 1999; Weatherbee et al., 2006; Cooper et al., 2018).

Montero y cols. en 2016 han mostrado que los BMPs promueven la aparición de daño en el DNA en las células interdigitales indiferenciadas, lo que parece ser atribuible a las características epigenéticas de estas células en comparación con las células vecinas que van a formar los dedos (Sánchez-Fernández, et al., 2019, 2020). Esto causaría la muerte celular del tejido interdigital al fracasar el mecanismo reparador del daño en las células, pese a ponerse en marcha (Montero et al., 2016). Adicionalmente, parece ser que la activación de la expresión de los BMPs en el tejido interdigital, promueve la caída en la expresión de FGF en la cresta ectodérmica apical, con la subsiguiente degeneración de la misma y muerte del tejido interdigital, al caer esta fuente promotora de la supervivencia y proliferación celular (Weatherbee et al., 2006; Kaltcheva et al., 2016).

BMP2 tiene un papel predominante en promover la muerte celular interdigital (Kaltcheva et al., 2016), por lo que lo hemos elegido como marcador para analizar en este trabajo por hibridación *in situ*. En la figura 7 mostramos la expresión de *BMP2* en distintos estadios del desarrollo de la extremidad. La figura 7A nos muestra su expresión en el esbozo inicial de la extremidad (HH23), donde apreciamos una intensa expresión en la región posterior del esbozo. Estudios iniciales asociaron esta expresión de BMP2, a un papel como intermediario en el circuito de retroalimentación establecido entre el gen *Sonic Hedgehog (Shh)* en el mesodermo posterior del esbozo y *FGF4* en la cresta ectodérmica apical, que modula el crecimiento de la extremidad en estos estadios iniciales, y participa en el desarrollo del patrón antero-posterior en la extremidad (Laufer et al., 1994). Sin embargo, trabajos de delección genética de distintos BMPs han descartado este papel (Bandyopadhyay et al., 2006).

En estadios más avanzados como los mostrados en la figura 7B (HH27), se mantiene cierto gradiente de expresión postero-anterior en el autopodio. En estos estadios se aprecia una fuerte expresión de *BMP2* en la región distal de los dedos en especificación. No hemos de olvidar que los BMPs son fuertes promotores de la condrogénesis y osteogénesis de los dedos, actuando de manera totalmente distinta en los precursores del interdígito (Bandyopadhyay et al., 2006; Montero et al., 2008). Finalmente, en estadios más avanzados, precediendo y durante los procesos de muerte celular interdigital, la expresión de *BMP2* es muy intensa en este tejido (ver figura 7C correspondiente a un estadio HH32). Es interesante también notar aquí, que *BMP2* tiene una expresión importante en las articulaciones de los dedos (figura 7C), en estos estadios avanzados de su formación. Esto sugiere que BMP2 puede estar ejerciendo un papel importante también en la maduración de las articulaciones.



Figura 7. Expresión de BMP2 durante la muerte interdigital y maduración de las articulaciones de los dedos. En la figura A se muestra el esbozo inicial de la extremidad de un embrión en estadío HH23 y en su parte posterior vemos una expresión intensa de *BMP2*; que pasa a ser en gradiente postero-anterior en B. La figura B es un autopodio de estadío HH27 donde la expresión de *BMP2* aparece menos intensa en los dedos. En la figura C (estadío HH32) *BMP2* se expresa en las articulaciones de los dedos y es muy intensa en el tejido interdigital coincidiendo con los procesos de muerte celular.

CONCLUSIONES

El presente trabajo es una revisión de la expresión y modo de acción de factores que intervienen en la morfogénesis de los dedos durante el desarrollo de la extremidad, utilizando como modelo de vertebrados con dedos libres, el embrión de pollo. Los genes seleccionados han sido: *Sox9*; *Scleraxis*; *Gdf5*; *MyoD*; *Cyp26A1*; y *BMP2*.

En base a la revisión experimental y bibliográfica realizada, podemos concluir que la totalidad de los genes propuestos ejercen un papel destacado a nivel molecular en la embriogénesis de las extremidades. Hemos obtenido pruebas e imágenes que indican y confirman las cuestiones que ya nos planteábamos inicialmente; por tanto, estas mismas y alguna cuestión más pueden servirnos como conclusiones extraídas del trabajo de investigación y estudio en profundidad, reflejados en el presente TFG:

- Uno de los cometidos de Sox9 es enfocar a las células indiferenciadas del mesénquima embrionario hacia la formación de cartílago; si falla la expresión de este factor por defecto, nos encontramos con la muerte de las células del autopodio y por tanto ausencia de formación de dedos.
- 2. *Sox9* genera agregados precondrogénicos en el esqueleto en desarrollo al inicio de la osificación endocondral y regula la producción de matriz extracelular cartilaginosa.
- 3. *Sox9* actúa en respuesta también a Activinas, TGFβs o BMPs en cuanto a la inducción condrogénica y se sabe que una expresión defectuosa por exceso de Sox9 genera polidactilia.
- 4. Hemos confirmado el papel temprano en la diferenciación fibrogénica que tiene *Scleraxis*. Este factor se manifiesta en el mesodermo del esbozo desde estadíos iniciales comportándose como un marcador excelente del mesodermo precursor los tendones.
- 5. En estadíos más avanzados se mantiene la expresión de *Scleraxis* en los tendones en formación; detectándose una fuerte expresión acompañando a los dedos que presentan todas sus falanges.
- 6. En cuanto al factor *Gdf5*, hemos encontrado en la extremidad del embrión de pollo una intensa expresión en zonas que posteriormente serán las articulaciones, confirmando los postulados ya existentes de que este factor participa en los procesos de formación de las mismas.
- 7. Las franjas de expresión de *Gdf5* se presentan entre el estilopodio y el zeugopodio, el zeugopodio y el autopodio, entre los metatarsianos y en estadíos algo más avanzados entre las falanges en formación.

- 8. La diferenciación miogénica desde el mesodermo embrionario (células indiferenciadas) es promovida por cuatro factores reguladores, y *MyoD* codifica para uno de ellos. Por el contrario, parece que la presencia de todos ellos no es estrictamente necesaria siempre para una correcta miogénesis.
- 9. *MyoD* tiene un importante papel en el desarrollo de los músculos de las extremidades y dedos. Esto queda demostrado mediante la visualización de su expresión en el tejido embrionario en diferentes dominios y láminas y con reorganizaciones de las mismas hasta formar vientres musculares, a medida que avanzan los distintos estadíos embrionarios.
- 10. Tras examinar la expresión de *Cyp26A1* obtenemos un resultado de compatibilidad con la regulación de los procesos de muerte celular programada. Encontramos expresión de este gen en la cresta ectodérmica apical cuando la extremidad está en los estadios iniciales de desarrollo. Posteriormente dejará de expresarse tanto en la AER para pasar a aparecer en el interdígito.
- 11. Cyp26A1 es un buen candidato para la modulación de los niveles de ácido retinoico (AR) en el interdígito, los cuales deben ser finamente regulados, puesto que como se ha descrito, un exceso de AR produce un incremento en la muerte celular interdigital y su inhibición genera la formación de sindactilias con un dedo ectópico.
- 12. Además, comprobamos que *Cyp26A1* presenta dominios de expresión en el tejido peridigital. Nuestra hipótesis es que aquí puede restringir los niveles de AR en los dedos y tejido conectivo peridigital, protegiendo de la muerte celular y favoreciendo así la maduración de los tejidos que forman el dedo definitivo.
- 13. La proteína morfogenética de hueso 2 (*BMP2*) junto con otra serie de BMPs que no se han estudiado aquí, al expresarse promueven la degeneración de la AER, por inhibición a su vez de la expresión de los FGFs. Consecuentemente ocurre la muerte del tejido interdigital indiferenciado, cuyo inductor podemos confirmar que es entre otros el *BMP2*.
- 14. Otro papel de los BMPs, muy dispar al que ejercen sobre el interdígito, es que son fuertes promotores de la condrogénesis y osteogénesis digital.
- 15. En estadíos más avanzados, *BMP2* parece poder tener un papel clave en la formación de las articulaciones.
- 16. Como mostramos en este trabajo, la monitorización de los patrones de expresión de genes por hibridación *in situ*, supone una buena herramienta para la visualización de los procesos involucrados en la morfogénesis animal. Esto nos delimita en las estructuras completas embrionarias, los territorios donde estos procesos se inician y se desarrollan, en lo que podríamos llamar una descripción de la "Anatomía molecular" del desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle enormemente a mi director del TFG, Juan Antonio Montero Simón, que no ha dudado en brindarme su ayuda siempre y ha estado accesible para todas las dudas y necesidades que se me han ido planteando en el desarrollo de este trabajo. Trabajar con él ha sido fácil y fluido, y gracias a él he podido conocer mejor y sentir más interés por el mundo de la embriología y la anatomía. Ha sido un placer tenerle como tutor.

Gracias a Sonia, por enseñarme a manejarme de manera independiente en el laboratorio y por tener paciencia conmigo en cada fallo; forma parte de este proyecto y además es otro apoyo sin el que no podría haber llegado hasta aquí, gracias por invertir tiempo en mí.

También gracias al equipo del laboratorio del departamento: Montse, Cristina, Goretti y Nacho por ayudarme con las piezas y las soluciones y orientarme. Me ha aportado un ambiente de trabajo buenísimo, haciéndome sentir muy a gusto. Gracias a J. M. Hurlé por su supervisión esporádica y por sus aportaciones y explicaciones.

Gracias a mis padres, sin ellos no hubiera llegado hasta aquí, donde siempre quise estar; aunque ha sido duro y largo ellos siempre me han apoyado para asegurarse de que pudiera conseguir todo lo que quisiera. Gracias a su esfuerzo he podido estudiar Medicina.

Para seguir, es imprescindible que le de las gracias a Mikel por los años de apoyo emocional que me ha dado en el transcurso de la carrera, que parecía no tener fin... sin él este camino hubiera sido aun mucho más arduo. Gracias por acompañarme siempre y también en cada paso de este proceso.

Quiero agradecerle a mi abuela todas las comidas calientes que me ha preparado tras mañanas de clases u hospital, para coger con fuerzas la tarde de estudio y prácticas.

Gracias a los profesores y médicos de los que he podido aprender en estos seis años, las enseñanzas y experiencias que me llevo son valiosas y cuentan como granos de arena para el futuro profesional y personal.

Gracias infinitas a mis amigos, a los de dentro y a los de fuera de la carrera. Los de fuera han sido como una brisa fresca, cuando ya no puedes más, que te renueva la energía. Los de dentro son realmente el mayor y más sincero apoyo que puedes tener, porque nadie te entiende como ellos, todos somos un equipo.

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. The retinoic acidmetabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. Genes Dev. 2001 Jan 15;15(2):226-40. doi: 10.1101/gad.855001.

Acloque H, Wilkinson DG, Nieto MA. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole-mount and tissue sections. Methods Cell Biol. 2008;87:169-85. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00209-4.

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev 16:2813–2828.

Akiyama H, Stadler HS, Martin JF, Ishii TM, Beachy PA, Nakamura T, de Crombrugghe B. 2006. Misexpression of Sox9 in mouse limb bud mesenchyme induces polydactyly and rescues hypodactyly mice. Matrix Biol. 26(4):224-33. doi: 10.1016/j.matbio.2006.12.002.

Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S, Fujisawa Y. 1995. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. Biochemical and Biophysical Research Communications 210:670–677. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1712

Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. PLoS Genet. 2006 Dec;2(12):e216. doi: 10.1371/journal.pgen.0020216.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugghe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. Nat Genet 22:85–89.

Braun T, Arnold HH. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. EMBO J. 1995 Mar 15;14(6):1176-86. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07101.x.

Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, et al. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. Dev Biol 257:292–301.

Cooper LN, Sears KE, Armfield BA, Kala B, Hubler M, Thewissen JGM. Review and experimental evaluation of the embryonic development and evolutionary history of flipper development and hyperphalangy in dolphins (Cetacea: Mammalia). Genesis. 2018 Jan;56(1). doi: 10.1002/dvg.23076. Epub 2017 Oct 25.

Dubrulle J, Pourquié O. fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. Nature 2004 Jan 29;427(6973):419-22. doi: 10.1038/nature02216.

Dunwoodie SL, Wallingford, JB Diseases of development: leveraging developmental biology to understand human disease. Development. 2020. PMID: 33184105

Ehata S, Miyazono K. Bone Morphogenetic Protein Signaling in Cancer; Some Topics in the Recent 10 Years. Front Cell Dev Biol. 2022 May 25;10:883523. doi: 10.3389/fcell.2022.883523. eCollection 2022.

Etzioni S, Yafe A, Khateb S, Weisman-Shomer P, Bengal E, Fry M.Homodimeric MyoD preferentially binds tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes. J Biol Chem. 2005 Jul 22;280(29):26805-12. doi: 10.1074/jbc.M500820200. Epub 2005 May 27.

Fernández-Terán MA, Hinchliffe JR, Ros MA. Birth and death of cells in limb development: a mapping study. 2006. Dev Dyn. Sep;235(9):2521-37. doi: 10.1002/dvdy.20916.

Gañan Y, Macias D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurle JM. 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. Aug;122(8):2349-57. doi: 10.1242/dev.122.8.2349.

Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B, Mishina Y. TGF-β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 May 1;10(5):a022202. doi: 10.1101/cshperspect.a022202

Guo J, Wu G. The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev. 2012. Feb-Apr;23(1-2):61-7. doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.02.001.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. Nature. 1993 Aug 5;364(6437):501-6. doi: 10.1038/364501a0.

Hockman, D., Cretekos, C. J., Mason, M. K., Behringer, R. R., Jacobs, D. S., & Illing, N. 2008. A second wave of Sonic hedgehog expression during the development of the bat limb. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 16982–16987.

Huang AH, Watson SS, Wang L, Baker BM, Akiyama H, Brigande JV, Schweitzer R. Requirement for scleraxis in the recruitment of mesenchymal progenitors during

embryonic tendon elongation. Dev. 2019;146(20):1-8. doi.org/10.1242/dev.182782.

Hurlé, J. M., Hinchliffe, J. R., Ros, M. A., Critchlow, M. A. and Genis- Galvez, J. M. (1989). The extracellular matrix architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part of the developing chick limb: an ultrastructural, histochemical and immunocytochemical analysis. Cell Differ. Dev. 27, 103-120.

Hurlé, J. M., Ros, M. A., Ganan, Y., Macias, D., Critchlow, M. and Hinchliffe, J. R. (1990). Experimental analysis of the role of ECM in the patterning of the distal tendons of the developing limb bud. Cell Differ. Dev. 30, 97-108.

Ito MM, Kida MY. Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. J Anat. 2000;197(4):659-679. https://doi.org/10.1017/S0021878299006974.

Jia S, Meng A. TGF β family signaling and development. Development. 2021 Mar 12;148(5):dev188490. doi: 10.1242/dev.188490.

Jin L, Wu J, Bellusci S, Zhang JS. Fibroblast Growth Factor 10 and Vertebrate Limb Development. Front Genet. 2019 Jan 7;9:705. doi: 10.3389/fgene.2018.00705. eCollection 2018.

Kaito T, Morimoto T, Mori Y, Kanayama S, Makino T, Takenaka S, Sakai Y, Otsuru S, Yoshioka Y, Yoshikawa H. 2018. BMP-2/7 heterodimer strongly induces bone regeneration in the absence of increased soft tissue inflammation. The Spine Journal 18:139–146. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2017.07.171

Kaltcheva MM, Anderson MJ, Harfe BD, Lewandoski M. 2016. BMPs are direct triggers of interdigital programmed cell death. Dev Biol. Mar 15;411(2):266-276. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.12.016.

Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. Development. 1998 Oct;125(20):4019-32. doi: 10.1242/dev.125.20.4019.

Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S.Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. Nature. 2004 Sep 23;431(7007):466-71. doi: 10.1038/nature02876.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Br J. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33.

Kieny, M. and Chevallier, A. (1979). Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. J. Embryol. Exp. Morphol. 49, 153-165

Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. Cell 1994;79: 993–1003.

Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(12):2195-214. doi: 10.1016/j.biocel.2007.05.019. Epub 2007 Jun 6.

Léjard V, Brideau G, Blais F, Salingcarnboriboon R, Wagner G, Roehrl MH, Noda M, Duprez D, Houillier P, Rossert J. Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- α 1(I) collagen gene in tendón fibroblasts. J Biol Chem. 2007;282(24):17665-17675. doi.org/10.1074/jbc.M610113200.

Leslie EJ. Embracing human genetics: a primer for developmental biologists. Development. 2020 Jul 2;147(21): dev191114. doi: 10.1242/dev.191114.

Lluís F, Ballestar E, Suelves M, Esteller M, Muñoz-Cánoves P. E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. EMBO J. 2005 Mar 9;24(5):974-84. doi: 10.1038/sj.emboj.7600528.

Lorda-Diez CI, Garcia-Riart B, Montero JA, Rodriguez-León J, Garcia-Porrero JA, Hurle JM. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence.

Aging (Albany NY). 2015 Nov;7(11):974-85. doi: 10.18632/aging.100844.

Lorda-Diez CI, Duarte-Olivenza C, Hurle JM, Montero JA. Transforming growth factor beta signaling: The master sculptor of fingers. Dev Dyn. 2022 Jan;251(1):125-136. doi: 10.1002/dvdy.349. Epub 2021 May 6.

Macias D, Gañan Y, Sampath TK, Piedra ME, Ros MA, Hurle JM. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. Development. 1997 Mar;124(6):1109-17. doi: 10.1242/dev.124.6.1109.

Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Hurle JM. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. Development. 1999a Dec;126(23):5515-22. doi: 10.1242/dev.126.23.5515.

Merino R, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurle JM. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. Dev Biol. 1999b Feb 1;206(1):33-45. doi: 10.1006/dbio.1998.9129.

Mitrovic D. Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. Am J Anat. 1978;151(4):475-485. https://doi.org/10. 1002/aja.1001510403.

Montero JA, Kilian B, Chan J, Bayliss PE, Heisenberg CP. Phosphoinositide 3-kinase is required for process outgrowth and cell polarization of gastrulating mesendodermal cells. Curr Biol. 2003 Aug 5;13(15):1279-89. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00505-0.

Montero JA, Carvalho L, Wilsch-Bräuninger M, Kilian B, Mustafa C, Heisenberg CP. Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation. Development. 2005 Mar;132(6):1187-98. doi: 10.1242/dev.01667. Epub 2005 Feb 9.

Montero JA, Zuzarte-Luis V, Garcia-Martinez V, Hurle JM. Dev Biol. Role of RhoC in digit morphogenesis during limb development. 2007 Mar 1;303(1):325-35. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.019. Epub 2006 Nov 16.

Montero JA, Lorda-Diez CI, Gañan Y, Macias D, Hurle JM. Activin/TGFbeta and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. Dev Biol. 2008 Sep 15;321(2):343-56. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.022.

Montero JA, Hurlé JM. Sculpturing digit shape by cell death. Apoptosis. 2010 Mar;15(3):365-75. doi: 10.1007/s10495-009-0444-5.

Montero JA, Lorda-Diez CI, Francisco-Morcillo J, Chimal-Monroy J, Garcia-Porrero JA, Hurle JM. Sox9 Expression in Amniotes: Species-Specific Differences in the Formation of Digits. Front Cell Dev Biol. 2017 Mar 23;5:23. doi: 10.3389/fcell.2017.00023. eCollection 2017.

Mueller TD, Nickel J. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. FEBS Lett. 2012 Jul 4;586(14):1846-59. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.043.

Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin, CJ, Schweitzer R. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. Development. 2007;134 (14):2697-2708. https://doi.org/10.1242/dev.001933.

Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect.Nature. 1993 Aug 5;364(6437):532-5. doi: 10.1038/364532a0.

Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Kyuno D, Ono Y, Magara K. Retinoic acid metabolism in cancer: potential feasibility of retinoic acid metabolism blocking therapy. Med Mol Morphol. 2023 Jan 2. doi: 10.1007/s00795-022-00345-6.

Pennimpede T, Cameron DA, MacLean GA, Li H, Abu-Abed S, Petkovich M.The role of CYP26 enzymes in defining appropriate retinoic acid exposure during embryogenesis. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010 Oct;88(10):883-94. doi: 10.1002/bdra.20709.

Pera E, Stein S, Kessel M. Development. Ectodermal patterning in the avian embryo: epidermis versus neural plate. 1999 Jan;126(1):63-73. doi: 10.1242/dev.126.1.63.

Perry RL, Rudnick MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. Front Biosci. 2000 Sep 1;5:D750-67. doi: 10.2741/perry

Petkovich M. Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoicacidreceptors.AnnuRevNutr.1992;12:443-71.doi:10.1146/annurev.nu.12.070192.002303.

Płusa B, Piliszek A. Common principles of early mammalian embryo self-organisation. Development. 2020 Jul 22;147(14):dev183079. doi: 10.1242/dev.183079.

Rodriguez-Guzman M, Montero JA, Santesteban E, Gañan Y, Macias D, Hurle JM. Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic acid signaling. Dev Biol. 2007 Feb 1;302(1):267-80. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.034. Epub 2006 Sep 26.

Rodriguez-Leon J, Merino R, Macias D, Gañan Y, Santesteban E, Hurle JM. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. Nat Cell Biol. 1999 Jun;1(2):125-6. doi: 10.1038/10098.

Rossant J, Tam PPL. Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. Dev Cell. 2022 Jan 24;57(2):152-165. doi: 10.1016/j.devcel.2021.12.022.

Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 2019. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Sambasivan R, Gayraud-Morel B, Dumas G, Cimper C, Paisant S, Kelly RG, Tajbakhsh S.Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. Dev Cell. 2009 Jun;16(6):810-21. doi: 10.1016/j.devcel.2009.05.008.

Sanchez-Fernandez C, Lorda-Diez CI, García-Porrero JA, Montero JA, Hurlé JM. UHRF genes regulate programmed interdigital tissue regression and chondrogenesis in the embryonic limb. Cell Death Dis. 2019 Apr 25;10(5):347. doi: 10.1038/s41419-019-1575-4.

Sanchez-Fernandez C, Lorda-Diez CI, Hurlé JM, Montero JA. The methylation status of the embryonic limb skeletal progenitors determines their cell fate in chicken. Commun Biol. 2020 Jun 5;3(1):283. doi: 10.1038/s42003-020-1012-3.

Saunders JW Jr. 1966. Death in embryonic systems. Science 154: 604–612. doi:10.1126/science.154.3749.604

Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterio-posterior axis within the mouse embryo.

Genes Dev. 2001 Jan 15;15(2):213-25. doi: 10.1101/gad.851501.

Schmid B Fürthauer M Connors SA Trout J Thisse B Thisse C Mullins MC. 2000. Equivalent genetic roles for bmp7/snailhouse and bmp2b/swirl in dorsoventral pattern formation. Development 127:957–967.

Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. Development. 2001 Oct;128(19):3855-66. doi: 10.1242/dev.128.19.3855.

Storm EE, Kingsley DM. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. Development. 1996 Dec;122(12):3969-79. doi: 10.1242/dev.122.12.3969.

Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M.A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. J Biol Chem. 2004 Jan 2;279(1):77-85. doi: 10.1074/jbc.M308337200. Epub 2003 Oct 7.

Valera E, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisúa Belmonte JC, Choe S. 2010. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells PLOS ONE 5:e11167. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011167

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, et al. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. Cell 79:1111–1120.

Wang YH, Beck CW. Distal expression of sprouty (spry) genes during Xenopus laevis limb development and regeneration. Gene Expr Patterns. 2014 May;15(1):61-6. doi: 10.1016/j.gep.2014.04.004. Epub 2014 May 10.

Weatherbee, S., Behringer, R., Rasweiler, J., & Niswander, L. (2006). Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103, 15103–15107.

White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G, Petkovich M. J. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. Biol Chem. 1997 Jul 25;272(30):18538-41. doi: 10.1074/jbc.272.30.18538.

Wilkinson DG, Nieto MA. Detection of Messenger RNA by in Situ hybridization to tissue sections and whole mounts. Methods in Enzymology. 1993;225: 365-373 1993. doi: 10.1016/0076-6879(93)25025-W.

Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, Leder P, Deng C. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. Development. 1998 Feb;125(4):753-65. doi: 10.1242/dev.125.4.753.

Yang R, Goedel A, Kang Y, Si C, Chu C, Zheng Y, Chen Z, Gruber PJ, Xiao Y, Zhou C, Witman N, Eroglu E, Leung CY, Chen Y, Fu J, Ji W, Lanner F, Niu Y, Chien KR. Amnion signals are essential for mesoderm formation in primates. Nat Commun. 2021 Aug 26;12(1):5126. doi: 10.1038/s41467-021-25186-2.

Zhai J, Xiao Z, Wang Y, Wang H. Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. Trends Cell Biol. 2022 Jan;32(1):18-29. doi: 10.1016/j.tcb.2021.07.008. Epub 2021 Aug 17.

Zhao X, Brade T, Cunningham TJ, Duester G. Retinoic acid controls expression of tissue remodeling genes Hmgn1 and Fgf18 at the digit-interdigit junction. Dev Dyn. 2010 Feb;239(2):665-71. doi: 10.1002/dvdy.22188.

Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. Science. 1996 May 3;272(5262):738-41. doi: 10.1126/science.272.5262.738.

Zuzarte-Luis V, Montero JA, Rodriguez-León J, Merino R, Rodríguez-Rey JC, Hurlé JM. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. Dev Biol. 2004 Aug 1;272(1):39-52. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.04.015.