



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Divergencia de expresión de genes claves de la osteogénesis se asocia a
cambios fenotípicos entre *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Bióloga

Lefney Ayvlen Cumilaf Saavedra

Concepción, Junio de 2025

Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

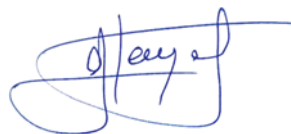
Prof. Guía

Dr. Sylvain Marcellini Liotaud

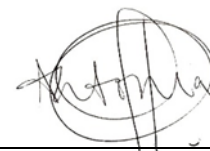


Prof. Evaluadores

Dra. Marcella Torrejón Quezada



Dra. Antonia Recabal Beyer



Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander



Concepción, Junio de 2025

AGRADECIMIENTOS

Especialmente, me gustaría agradecerle a mi mamá, que con su amor me ha impulsado durante toda mi vida. Y a mi papá, que desde un inicio me ha apoyado en mis decisiones, animándome a intentarlo sin hacer caso a dudas y miedos. También a mis abuelas y abuelos, que siempre me reciben y esperan con los brazos abiertos. A mis hermanas, tías, tíos, primas y primos. Doy gracias a mi gran familia que día a día, a pesar de la distancia, me entregan energía con su alegría, palabras y sonrisas.

A mis amigas y amigos que me encontré en esta etapa, sobre todo, a Anastassia y Marco, que nos hemos acompañado en cada paso desde que partimos la carrera. Y a Fernanda, que nos cruzamos mucho más adelante, y hoy es parte de mi felicidad diaria.

Al LADE, que para mí no sólo se convirtió en un espacio de crecimiento personal y académico, sino también en un lugar lleno de cariño y risas. En particular, le agradezco a Marco M. y a Japhet, que me han enseñado desde que entré al laboratorio, y ahora siguen compartiéndome su amistad. Y por supuesto, al Dr. Sylvain Marcellini, que guió esta tesis y me ha permitido ingresar al mundo de la ciencia con múltiples experiencias y oportunidades valiosas.

Agradezco la existencia de estas personas que, solo con su presencia, me empujan a perseguir la vida que quiero.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
La esquelotogénesis.	9
1A) Endocondral e intramembranosa.	9
1B) La matriz ósea.....	9
Regulación de la diferenciación osteoblástica.....	11
Regulación de la osteocitogénesis.....	12
La evolución de la esquelotogenesis.	13
<i>Xenopus laevis</i> y <i>Xenopus tropicalis</i> como modelo para estudiar evolución de la esquelotogénesis	14
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general:	19
Objetivos específicos:	19
METODOLOGÍA	20
Preparación de muestras:	20
Preparación de cortes:	20
Tinciones fluorescentes.	20
Microscopía electrónica de barrido.....	21
Hibridación <i>in Situ</i> :	21
Preparación de calvaria de <i>Xenopus laevis</i>	21
Fase de detección.	22
Fase de amplificación.	22
RESULTADOS	24
Diferentes dinámicas de osificación y expresión de genes en <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>	24
Disposición de fibras de colágeno en hueso frontoparietal de <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>	26
Participación de genes de colágeno no tradicionales en el depósito de matriz ósea.....	30
DISCUSIÓN	38

¿Divergencia evolutiva? Regulación genética diferencial provoca patrones óseos independientes entre <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>.	38
Biología del osteocito en la matriz de hueso.	39
Análisis espacio-temporal de genes de colágeno en hueso frontoparietal de <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>.	40
CONCLUSIÓN	42
BIBLIOGRAFIA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de osificación endocondral e intramembranosa	12
Figura 2. Mineralización del hueso en <i>X. tropicalis</i>	16
Figura 3. Historia evolutiva de <i>X. laevis</i> y <i>X. tropicalis</i>	17
Figura 4. Data preliminar con los niveles de expresión de <i>tfap2b</i> , <i>phospho1</i> y <i>col2a1</i>	18
Figura 5. Comparado a <i>Xla</i> , <i>Xtr</i> demuestra una condición fenotípica y genética similar a craneosinostosis.....	28
Figura 6. Microscopía de excitación de dos fotones de calvaria de <i>Xla</i> y <i>Xtr</i>	30
Figura 7. Divergencia en osteocitogénesis.....	32
Figura 8. Hibridación <i>in Situ</i> -HCR de <i>col2a.S</i> en hueso frontoparietal y pata juvenil de <i>Xla</i>	35
Figura 9. Hibridación <i>in Situ</i> -HCR de <i>coll8a.L</i> en hueso frontoparietal.....	37
Figura 10. Hibridación <i>in Situ</i> -HCR de <i>pcolce.L</i> en hueso frontoparietal.....	39

RESUMEN

Las ranas *Xenopus tropicalis* (*Xtr*) y *Xenopus laevis* (*Xla*) ofrecen un contexto biológico y genético ideal para entender cómo cambios transcripcionales se relacionan con cambios fenotípicos, lo que es un desafío constante en la disciplina EvoDevo. En particular, mientras *Xtr* es diploide al igual que *Homo sapiens*, *Xla* contiene dos subgenomas producto de un evento de hibridación. Es de nuestro particular interés entender cómo ha evolucionado el proceso de osteogénesis, así como el programa genético óseo entre ambas especies. Como data preliminar del Laboratorio de Desarrollo y Evolución (LADE), un análisis de RNA-Seq revela dinámicas de expresión diferencial en diversos genes (*tfap2b*, *phospho1* y *col2a1*) posiblemente asociados a cambios morfogenéticos de la calvaria. Considerando estos antecedentes, **nuestra hipótesis de trabajo** es que: **Existe una relación en los cambios de expresión observados en *tfap2b*, *phospho1* y *col2a1* con diferencias en temporalidad de cierre craneal, osteocitogénesis y expresión de genes de matriz, respectivamente.** En base a esto, **nuestro objetivo general** es: Examinar cómo los cambios de expresión observados en *tfap2b*, *phospho1* y *col2a1* se relacionan respectivamente con diferencias de temporalidad de cierre craneal, de osteocitogénesis, y de expresión de genes de matriz entre *Xla* y *Xtr*. El **primer objetivo específico** es: Determinar si la mayor expresión de *tfap2b* en *Xtr* se correlaciona con una condición de tipo craneosinostosis. En síntesis, se encontró una diferencia en las tasas de osificación relativas para *Xla* y *Xtr* asociadas a diferentes dinámicas de expresión de genes osteogénicos, dentro de los cuales, *tfap2* actúa como regulador positivo favoreciendo el depósito aberrante de hueso en *Xtr*, provocando un fenotipo similar al de craneosinostosis. El **segundo objetivo específico** es: Caracterizar y comparar el proceso de osteocitogénesis entre ambas especies, lo que involucra la visualización de la matriz por medio de microscopía dos fotones y análisis con microscopía electrónica de barrido (MEB), hallándose una morfología de tipo hueso lamelar para *Xla*, con menor cantidad de lagunas osteocíticas que *Xtr*, pero de mayor tamaño, asociado a la acción de *phospho1*, entre otros genes. El **tercer objetivo específico** es: Analizar la expresión de genes de matriz colagenosa sobrerregulados en *Xla*, este objetivo implica el uso de sondas específicas, y la observación de expresión espacio-temporal mediante hibridación *in situ* HCR, donde finalmente una serie de genes de colágeno, entre ellos *col2a1*, presentó una sobreexpresión en osteoblastos de *Xla*. Este trabajo representa un avance en el conocimiento respecto a los cambios de expresión génica asociados a evolución de (i) morfogénesis del cierre craneal, (ii) osteocitogénesis y (iii) composición de la matriz ósea en anfibios.

ABSTRACT

The frogs *Xenopus tropicalis* (*Xtr*) and *Xenopus laevis* (*Xla*) offer an ideal biological and genetic context to understand how transcriptional changes relate to phenotypic changes, which remains a constant challenge in the EvoDevo discipline. In particular, while *Xtr* is diploid like *Homo sapiens*, *Xla* contains two subgenomes resulting from a hybridization event. We are particularly interested in understanding how the process of osteogenesis and the bone genetic program have evolved between these two species. As preliminary data from the Laboratory of Development and Evolution (LADE), a comparative RNA-Seq analysis reveals striking differential expression dynamics in several genes (*tfap2b*, *phosphol*, and *col2a1*), possibly associated with morphogenetic changes in the calvaria. Based on this background, our hypothesis is that: **The expression changes observed in *tfap2b*, *phosphol*, and *col2a1* are associated with differences in the timing of cranial closure, osteocytogenesis, and matrix gene expression, respectively.** Accordingly, **our general objective is:** To examine how the expression changes observed in *tfap2b*, *phosphol*, and *col2a1* are respectively related to differences in the timing of cranial closure, osteocytogenesis, and matrix gene expression between *Xla* and *Xtr*. The **first specific objective** is: To determine whether the higher expression of *tfap2b* in *Xtr* correlates with a change in matrix deposition analogous to a craniosynostosis-like condition. In summary, a difference was found in the relative ossification rates for *Xla* and *Xtr*, associated with distinct expression dynamics of osteogenic genes, among which *tfap2* acts as a positive regulator promoting aberrant bone deposition in *Xtr*, leading to a craniosynostosis-like phenotype. The **second specific objective** is: To characterize and compare the process of osteocytogenesis between the two species, which involves matrix visualization through two-photon microscopy and analysis with scanning electron microscopy (SEM). A lamellar bone morphology was found for *Xla*, with fewer osteocytic lacunae than *Xtr* but of larger size, associated with the action of *phosphol* and other genes. The **third specific objective** is: To analyze the expression of collagenous matrix genes that are upregulated in *Xla*. This objective involves the use of specific probes and the observation of spatiotemporal expression through HCR *in Situ* hybridization, where a set of collagen genes, including *col2a1*, showed overexpression in osteoblast cells of *Xla*. This work represents an advance in understanding gene expression changes associated with the evolution of (i) cranial closure morphogenesis, (ii) osteocytogenesis, and (iii) bone matrix composition in amphibians.

INTRODUCCIÓN

La esquelotogénesis.

1A) Endocondral e intramembranosa.

Dentro de los vertebrados, el hueso se destaca cumpliendo un rol como tejido de soporte, siendo el principal componente del esqueleto junto al cartílago. El esqueleto se forma a partir de tres linajes celulares embrionarios distintos: desde las células de la cresta neural craneal se desarrolla el esqueleto craneofacial, el esqueleto axial deriva de somitas, y los huesos apendiculares son producto de las células mesodérmicas de la placa lateral (Olsen et al., 2000).

El desarrollo del hueso puede ser mediante dos vías, tanto intramembranosa como endocondral (**Fig. 1**). La osificación endocondral origina los huesos irregulares o largos, como las vértebras y las extremidades cuando un agregado de células progenitoras mesenquimales se diferencian a condrocitos, células que secretarán matriz cartilaginosa y aumentan considerablemente su volumen celular mediante hipertrofia (Long & Ornitz, 2013). Se ha demostrado que, aunque la mayoría de los condrocitos se eliminan por apoptosis, una fracción de ellos transdiferencia a osteoblastos, formando así el nuevo tejido óseo (**Fig. 1**) (Tsang et al., 2015). Por otro lado, unos pocos huesos son formados por osificación intramembranosa, estos serían los huesos planos, como el cráneo y la clavícula (Hartmann, 2009). En este caso, el tejido mesenquimático se diferencia directamente a osteoblastos, que corresponden a células formadoras de matriz ósea (**Fig. 1**) (Berendsen & Olsen, 2015). También, encargadas de la reabsorción ósea están los osteoclastos, que derivan de un linaje hematopoyético (Kobayashi & Kronenberg, 2005).

1B) La matriz ósea.

El hueso es un tejido mineralizado en constante remodelación, compuesto por un ensamblaje de colágeno y cristales de hidroxapatita (Garnero, 2015). La matriz ósea extracelular consiste principalmente de largas fibras de colágeno, que le confieren tensión y dureza al hueso al estar repletas del mineral hidroxapatita, conformado por calcio y fosfato ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Stock, 2015). Las proteínas de colágeno son las más abundantes, y están fuertemente asociadas a la mineralización del esqueleto (Landis & Jacquet, 2013). Molecularmente, el colágeno es una triple hélice de polipéptidos de cadenas α , y las fibras son sintetizadas a partir de procolágeno (Canty & Kadler, 2005). La familia de colágenos es amplia, en vertebrados hay al menos 28 tipos de colágeno (léase a *col2a1* como gen que codifica para la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo 2), y pueden

clasificarse según sus funciones, donde se encuentra la formación de fibras, actuar como proteínas transmembrana, angiogénesis, morfogénesis, adición celular, migración celular, reparación del tejido, entre otras (Kadler et al., 2007).

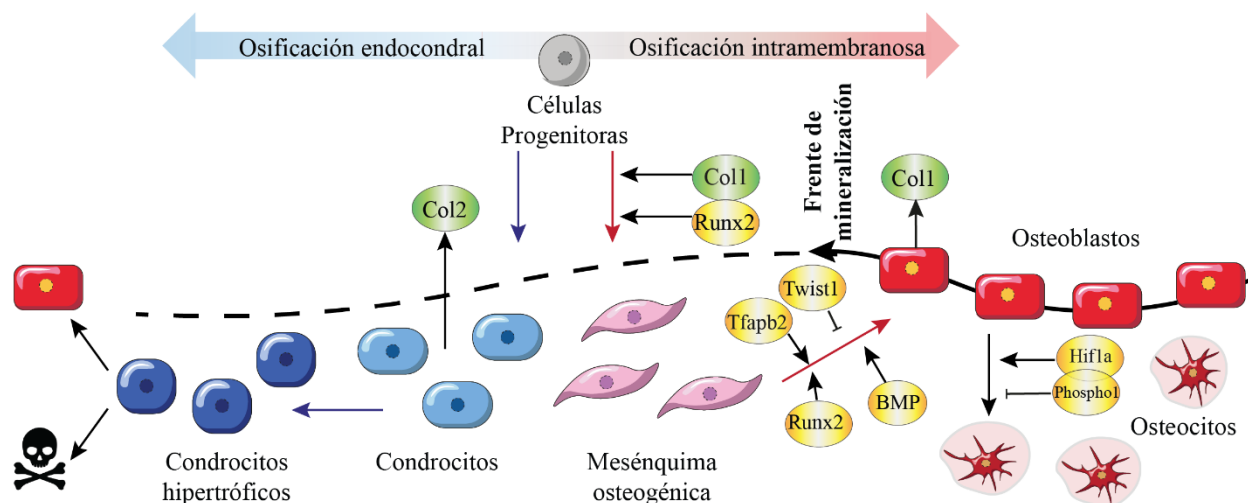


Figura 1. Esquema de osificación endocondral e intramembranosa. En la osificación endocondral, las células osteoprogenitoras diferenciarán a condrocitos que producen cartílago, en gran parte por la activación de la expresión de *col2a1*. Estos a su vez pasarán a ser condrocitos hipertróficos, cuales tienen dos posibles destinos: muerte celular o diferenciación a osteoblastos, productores de matriz ósea. Por otro lado, huesos que se originan por vía intramembranosa se desarrollan a partir de células mesenquimáticas que expresan factores de transcripción como *runx2*, *tfap2*, *twist1* y de BMP, permitiendo la diferenciación a osteoblastos, los cuales, por acción de las proteínas HIF1 α y PHOSPHO1, entre otros, fomentan la diferenciación a osteocitos que se embeben en la matriz ósea habitando un espacio denominado laguna osteocítica.

Las células encargadas de secretar las proteínas de la matriz extracelular, como aquellas de la familia de colágeno, son los osteoblastos. En un inicio, la primera matriz de hueso que es depositada por los osteoblastos no es mineralizada, esta se conoce como osteoide, pero posteriormente, se ve reemplazado por el tejido mineralizado rico en calcio que se encuentra en forma de hidroxapatita (Hall, 2005) junto al Colágeno tipo I, que entrega el soporte estructural al esqueleto (**Fig. 1**). Las proteínas de colágeno cumplen un rol importante en la mineralización de

tejidos esqueléticos (Glimcher et al., 1957); el tipo de osificación (intramembranosa o endocondral) afectaría directamente el aumento variable de la expresión transcriptómica en ciertas secuencias reguladoras (Bou-Gharios et al., 1996). Por ejemplo, se conoce que los genes de colágeno tipo 1 por lo general tienen una alta expresión en osteoblastos, como el gen *colla2* de ratón que tiene alta expresión en tejidos endógenos como el hueso (Khillan et al., 1986). Por otro lado, los genes de colágeno tipo 2 se relacionan comúnmente con la formación de tejido cartilaginoso (Exposito et al., 2010), como *col2a1* que está largamente asociado a la actividad endocondral en mamíferos y es conocido como un marcador de condrocitos (**Fig. 1**) (Zhao et al., 1997).

Esta tesis tiene un enfoque en el desarrollo óseo intramembranoso, por tanto, a continuación, se describe el proceso de diferenciación a osteoblastos y a osteocitos, las células que mantienen la estructura ósea.

Regulación de la diferenciación osteoblástica.

Naturalmente, la formación del esqueleto durante el desarrollo contempla una temporalidad, y hay una fuerte regulación del correcto control del desarrollo óseo. La osificación depende de la actividad osteoblástica, derivadas de la condensación de células mesenquimales (Rodríguez-Carballo et al., 2011), y es permitida por la expresión de factores de transcripción en fases específicas, cuya activación provoca la diferenciación a osteoblastos desde las células osteoprogénitoras. Para esto, es clave la comunicación de las células con el ambiente, siendo necesarias las señales externas recibidas y coordinadas por las diferentes vías de señalización participando en este proceso (Salhotra et al., 2020). Entonces, para que exista un proceso coordinado del desarrollo apropiado del hueso participan diversos gradientes morfogénicos. Por ejemplo, la señal de la vía de señalización BMP (Bone Morphogenetic Proteins) induce la diferenciación y maduración del osteoblasto en células con expresión del factor de transcripción *runx2* (**Fig. 1**) (Runt-related transcription factor 2) (Salhotra et al., 2020; Long, 2012). La alta expresión de *runx2* en osteoblastos inmaduros lo convierte en un conductor principal del desarrollo esquelético y esencial para la diferenciación a osteoblastos (Kawane et al., 2014).

Runx2 es suficiente para la formación de hueso intramembranoso en la embriogénesis al dirigir células mesenquimales a osteoblásticas en base a (Maeno et al., 2011), que generó un transgénico de ratón de *runx2* bajo el control del promotor *prrx1*, encontrando que su expresión temprana

induce la diferenciación a osteoblastos en el cráneo, formándose hueso intramembranoso durante la embriogénesis, aunque reducido en comparación a uno de clase silvestre (wild type-WT). El desarrollo y crecimiento del cráneo es un proceso complejo que involucra la interacción de múltiples elementos óseos, la duramadre y el cerebro (Cuellar et al., 2020). Se ha demostrado que anomalías congénitas ocurren en varios modelos de ratón al haber aberraciones en la diferenciación de células de la cresta neural (Komatsu et al., 2013; Mishina & Snider, 2014); dentro de los factores de transcripción relacionados a dicho proceso, *tfap2b*, que promueve la diferenciación a osteoblastos, también se ha establecido como un gen asociado a un fenotipo con fusión prematura de suturas craneales (**Fig. 1**) (Barrallo-Gimeno et al., 2004; Timberlake et al., 2019). Por otro lado, el gen *twist1*, que inhibe durante el inicio del desarrollo craneal la función de Runx2 en la esquelotogénesis y por tanto la diferenciación a osteoblastos, provoca malformaciones craneales severas en mutantes con pérdida de función del gen (Bialek et al., 2004; Bildsoe et al., 2016). Una de las patologías posibles de estas mutaciones en *twist1* es craneosinostosis, descrita como la fusión prematura de suturas craneales, sitios de crecimiento crítico en el hueso, provocando deformidades óseas (Rice et al., 2003). En conclusión, la diferenciación osteoblástica estaría sujeta a regulaciones positivas (por ejemplo, *runx2*, *tfap2b*, vía BMP) y negativas (por ejemplo, *twist1*), asegurando así una adecuada temporalidad del proceso de osificación esquelética (**Fig. 1**).

Regulación de la osteocitogénesis.

Los osteocitos derivan de osteoblastos maduros que se embeben en la matriz ósea, y, a pesar de que componen más del 90% de las células del hueso, los mecanismos detrás de la diferenciación desde osteoblasto a osteocito son ampliamente desconocidos, en comparación con la gran cantidad de trabajos publicados sobre la diferenciación osteoblástica (Dallas & Bonewald, 2010; Hirao et al., 2007). En la superficie, cuando un osteoblasto disminuye su producción de matriz es gradualmente enterrado por sus células vecinas, y en el proceso, se transforma a un osteocito maduro situado en un espacio denominado laguna osteocítica (Franz-Odenaal et al., 2006). Estos osteocitos interaccionan mediante canalículos, que conectan con la superficie ósea (Fritz et al., 2016), además de la vasculatura, proporcionando oxígeno (O₂) y nutrientes en un medio desafiante al estar completamente mineralizado (Zuo et al., 2015). Se ha demostrado que, *in vitro*, bajos niveles de tensión de oxígeno pueden promover la diferenciación osteoblasto-osteocito (Zahm et al., 2008), lo cual estaría regulado por factores de transcripción de la vía de señalización Hypoxia-

inducible factor α (HIF α), que son los principales responsables de los cambios de expresión de genes durante periodos con bajos niveles de O₂ (**Fig. 1**) (Graham & McCracken, 2019).

Si bien en un inicio se consideraba a los osteocitos células metabólicamente inactivas, hoy se sabe que, entre otras funciones, cumplen un rol tanto en el metabolismo del fosfato como en la disponibilidad del calcio e incluso puede remodelar su matriz perilacunar (Bonewald, 2011). Por ejemplo, PHOSPHO1 una proteína codificada por un gen de fosfato del mismo nombre, cumple un papel importante al inicio de la mineralización, y su deficiencia provoca un hueso hipomineralizado con un aumento en la cantidad de lagunas osteocíticas (**Fig. 1**) (Javaheri et al., 2015).

La evolución de la esquelogenesis.

El esqueleto es una de las innovaciones más importantes en vertebrados, y ha estado sujeto a extensos fenómenos evolutivos desde sus primeros registros en el Cámbrico temprano (Shimeld & Holland, 2000; Wada, 2010). Una estrategia utilizada para entender la evolución de la esquelogenesis ha sido comparar especies filogenéticamente relacionadas. Para nombrar algunos ejemplos, esta aproximación ha permitido entender de mejor forma la diferencia morfogénica entre dedos de murciélago y de ratón dada por diferencias en la proliferación y diferenciación de condrocitos (Sears et al., 2006); y la fragmentación de huesos craneales entre peces de cueva y de superficie, que ha sido un resultado indirecto de un intercambio entre la expansión sensorial y el desarrollo del cráneo (Powers et al., 2018).

El cráneo, si bien posee diferencias en sus mecanismos moleculares, se destaca por su flexibilidad en cuanto a forma y tamaño a pesar de poseer una estructura similar en todos los vertebrados, con una morfogénesis consistente (Hanken & Hall, 1993; Topczewska et al., 2016). Esto se puede ejemplificar con diferencias anatómicas entre los primeros homínidos y los *Homo sapiens* modernos (Lieberman et al., 2002), con adaptaciones evolutivas propiciadas como respuesta al ambiente y factores genéticos, provocando variaciones en el crecimiento del cráneo (Ang et al., 2022).

Los anfibios presentan un gran potencial para estudiar fenómenos de evolución esquelética. Tradicionalmente, dichos estudios han presentado un enfoque muy anatómico (Mundaca et al., 2024). Sin embargo, hay estudios que adoptan aproximaciones moleculares, como lo muestra un estudio reciente enfocado a la existencia de un sexto dedo presente tanto en *X. laevis* (*Xla*) como

en *X. tropicalis* (*Xtr*) (Hayashi et al., 2015). Si bien existe data sobre el desarrollo óseo de *Xt* (Fig. 2), a la fecha, no se conocen diferencias entre la osificación de *Xla* y *Xtr* que son las especies de anfibio más utilizadas en biología del desarrollo. Sin embargo, diferencias genómicas entre ambas ranas logran representar un modelo muy atractivo para estudios de EvoDevo, como se describe a continuación.

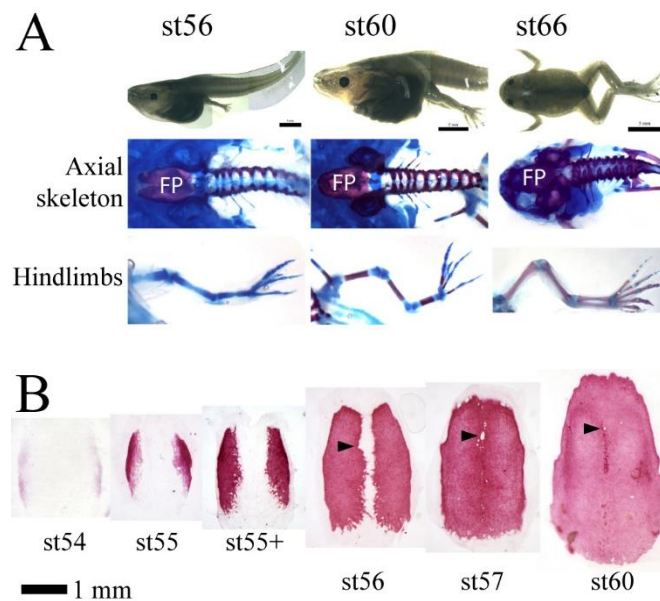


Figura 2: Mineralización del hueso en *X. tropicalis*. (A) Tinción de hueso y cartílago con Alizarin red y Alcian blue. Imágenes en la parte superior muestran al espécimen antes de ser teñidas (barra de escala: 5mm). Abajo, magnificación del esqueleto axial y extremidades posteriores (no a escala). (B) Hueso frontoparietal fue diseccionado en el estadio de desarrollo indicado y teñido con Alizarin red. Puntas de flecha indican el frente óseo cerrando. Obtenido desde (Espinoza et al., 2010). st: stage (etapa/estadio de desarrollo).

***Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* como modelo para estudiar evolución de la esquelotogénesis**

Dentro de los tetrápodos se encuentra el género de ranas *Xenopus*, donde dos de sus especies, *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, han sido altamente utilizadas en estudios de biología del desarrollo y celular, siendo un modelo ya bien caracterizado (Cannatella & De Sá, 1993). Se

encuentran disponibles referencias de su ontogenia (Nieuwkoop & Faber, 1967) y morfogénesis (Fox, 1984) desde hace ya varios periodos; además, sus genomas completos son de público acceso en el sitio web NCBI. *Xla* y *Xtr* son dos especies separadas por ~48 millones de años (Ma) (Session et al., 2016) que, aunque tienen un desarrollo similar, también presentan diferencias ontogenéticas notables. Se ha descrito que ambas especies mantienen una fuerte conservación en la expresión de la mayoría de sus genes ortólogos, esto no excluye que han acumulado una serie de cambios en sus genomas que inducen las diferencias en sus caracteres (Narbonne et al., 2011; Yanai et al., 2011).

La evolución de los fenotipos puede ocurrir por medio de distintos mecanismos, dentro de los cuales están los cambios regulatorios, que no alteran la estructura de la proteína, sino la cantidad producida, lo que puede influenciar al fenotipo alterando, por ejemplo, los tiempos de expresión y el tejido (Carroll, 2008). Además de cambios regulatorios, las duplicaciones en el genoma también son descritas como un importante mecanismo para innovación funcional al facilitar un incremento de la complejidad en organismos con mayor variación y diversidad morfológica (Meyer & Schartl, 1999). Glasauer & Neuhauss (2014) mencionan 3 resultados de un evento de duplicación: la inactivación de un gen, subfuncionalización y, menos común, neofuncionalización. Para Cordados, la primera duplicación de genoma completo podría haber sido antes de la Explosión Cámbrica, a lo que le continúa una segunda duplicación en el Devónico tardío. Dentro de las especies que pasaron por eventos de duplicación de forma específica está la rana africana *Xla*, que sufrió una duplicación de su genoma completo hace ~34 millones de años, presumiblemente tras una hibridación de sus progenitores diploides $2n=18$, con la subsecuente duplicación del genoma para restaurar el emparejamiento meiótico y herencia disómica (Session et al., 2016). Ahora su genoma es alotetraploide, es decir que posee 2 sets de cromosomas no homólogos (**Fig. 3**). Los dos subgenomas han evolucionado de forma diferente, por tanto, debido al tamaño correspondiente de los pares cromosomales de cada subgenoma, se les llama “L” (long) y “S” (short); *X. laevis* cuenta entonces con $2n=36$, casi el doble que su especie hermana, la rana africana modelo *X. tropicalis* con $2n=20$.

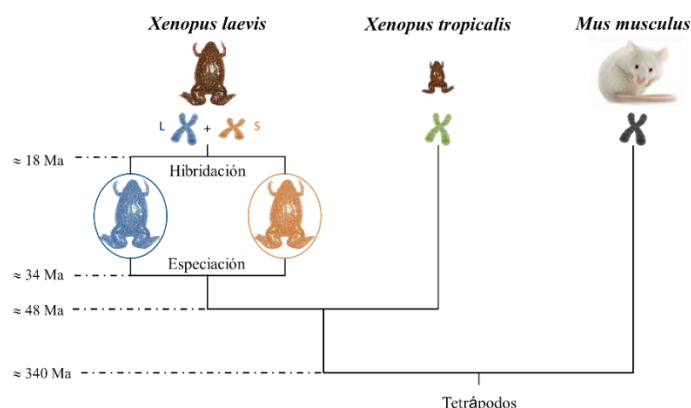


Figura 3: Historia evolutiva de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*. Modelo de divergencia, especiación e hibridación de *Xla*, *Xtr* y *Mus musculus*, este último utilizado para ejemplificar a una rama independiente de los tetrápodos. Se indica que *Xtr* es una especie más basal en comparación de *Xla*, que es producto de una hibridación de dos especies ancestrales hace 18 millones de años, la cual, provocó la duplicación de su material genético. Ma: millones de años.

La ocurrencia de cambios fenotípicos productos de cambios en la expresión de genes despierta gran interés en el campo de la biología del desarrollo y representa un enfoque fundamental de la disciplina EvoDevo (Richardson, 2022). En el LADE se da el enfoque en la evolución del esqueleto mineralizado de vertebrados, en especial a la caracterización del hueso frontoparietal o calvaria, pues, si bien se han estudiado por más de un siglo cambios evolutivos en la morfología del cráneo, en grupos clave como lo son los anfibios sigue una escasez de data (Piekarski et al., 2014). Además, poco se sabe en cuanto a los procesos moleculares de su osteogénesis, habiéndose concentrado más los estudios en aves y mamíferos (Miura et al., 2008).

Previamente en el LADE, a partir de tejidos osteogénicos en estadios de desarrollo determinados, se realizó un análisis de secuenciación del transcriptoma de la muestra en un momento dado, o RNA-Seq, el cual es un método común para analizar la expresión de los genes (Hrdlickova et al., 2017). Con ello, se pudo cuantificar el cambio de expresión génica durante el proceso de osificación de la calvaria en la transición mesénquima-osteoblasto de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* en estadio NF54 y NF60, respectivamente, encontrando diferencias de expresión significativas en los genes *tfap2b*, *phospho1* y *col2a1* (**Fig. 4**) entre ambas especies. Por ello, y en base a la literatura consultada, se propone que estos cambios de expresión estarían afectando de

forma desigual fenómenos de temporalidad de cierre craneal, osteocitogénesis, y depósito de matriz.

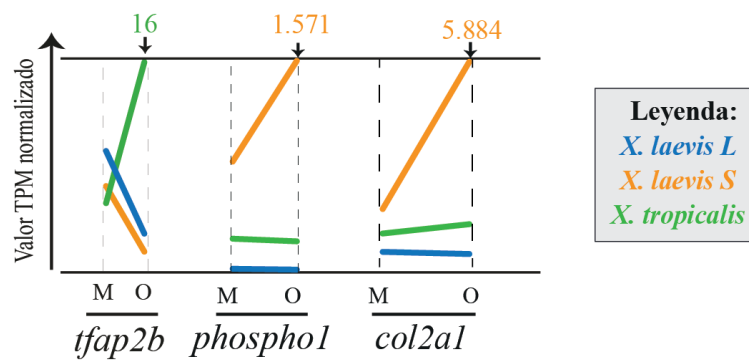


Figura 4: Data preliminar con los niveles de expresión de *tfap2b*, *phospho1* y *col2a1*. Niveles de expresión de *tfap2b*, *phospho1* y *col2a1* normalizados con valores TPM para mesénquima (M) y osteoblastos (O), para los genomas *XtL* (Azul), *XtS* (Naranja) y *Xt* (Verde). Todos los diagramas fueron ajustados a la misma altura, el mayor valor de TPM se señala con flechas.

HIPÓTESIS

Entre *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, cambios de expresión observados en *tfap2b*, *phosphol* y *col2a1* se relacionan respectivamente con diferencias de temporalidad de cierre craneal, de osteocitogénesis, y de expresión de genes de matriz.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Examinar como los cambios de expresión observados en *tfap2b*, *phospho1* y *col2a1* se relacionan respectivamente con diferencias de temporalidad de cierre craneal, de osteocitogénesis, y de expresión de genes de matriz entre las especies *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*.

Objetivos específicos:

1. Determinar si la mayor expresión de *tfap2b* en *Xenopus tropicalis* se correlaciona con una condición de tipo craneosinostosis.
2. Caracterizar y comparar el proceso de osteocitogénesis entre ambas especies.
3. Analizar expresión de genes de matriz colagenosa sobrerregulados en *Xenopus laevis*.

METODOLOGÍA

Preparación de muestras:

Según el estadio que fue necesario trabajar, los renacuajos fueron cuidadosamente seleccionados bajo lupa usando como guía la tabla de desarrollo de Nieuwkoop & Faber (Nieuwkoop & Faber, 1967).

De cada especie (*X. laevis* y *X. tropicalis*) se seleccionaron por experimento ~2 renacuajos NF57/NF55+ (transición mesénquima-hueso) y ~2 NF60 (hueso cerrado), estos se debieron anestesiar con una solución de 0,2g/L de tricaina (Sal metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo; MS-222, Sigma #5040) para ser sacrificados siguiendo recomendaciones bioéticas en base a Ramlochansingh et al., 2014 y Close et al., 1996. Tras un rápido corte a la vértebra del animal dormido se extrajeron en PBS 0,6% el cráneo y posteriormente la calvaria haciendo uso de pinzas, microtijeras y micropipeta.

Preparación de cortes:

Se obtuvieron cortes transversales en criostato para analizar características histológicas del hueso frontoparietal de ambas especies, y el estado de sus fibras de colágeno.

Primeramente, la calvaria completa debió ser incluida en OCT, un medio de montaje para criostato. Para ello, la muestra se fijó en PFA/Tween 4%, a 4°C toda la noche. Se continuó al día siguiente con 3 lavados de 15 minutos en PBS 1X, luego se dejaron en agitación con MORSE (10% citrato de sodio + 20% ácido fórmico) por una hora y media, para descalcificar el tejido duro. Finalmente, reposaron en 1ml de sacarosa 30% por dos días para deshidratar la muestra. Transcurrido el tiempo, se elaboraron tacos con la muestra contenida en el OCT; estos se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Tinciones fluorescentes.

En el caso del tejido completo, tras extraer la calvaria, se procedió a fijarla en 1ml de PFA/Tween 4% durante al menos 12 horas, a 4°C. Al siguiente día, las muestras pasaron por 4 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con 300µl de 0.3% Triton/PBS. Luego, dependiendo del experimento, se les agregó Alizarin Red (excitación 535nm) y/o Calcein Green (excitación 495nm) para diferenciar el hueso, que incubaron durante 2 horas protegidas de la luz; en cortes de criostato, se llevó directamente al microscopio. Posteriormente, atravesaron 4 ciclos de lavados de 15

minutos con 300µl de 0.3% Triton/PBS. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 15 minutos en 300µl de PBS 1X. Para ambos casos, el hueso frontoparietal fue montado en DAKO (Sigma-Aldrich).

Imágenes fueron obtenidas en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA-Biobio) de la Universidad de Concepción, en el Microscopio de láser multifotónico invertido (Zeiss LSM 780). En **Fig. 5** se aplicó el test de normalidad D'Agostino & Pearson. P-value se calculó con Mann-Whitney en grupos que no pasaron el test de normalidad, y en aquellos que sí, se realizó un unpaired t-test.

Utilizando el láser pulsado multi-fotónico, con microscopía 2 fotones se visualizó la estructura y organización de fibras de colágeno con un objetivo de 40x en inmersión aceitosa, priorizando la resolución de la imagen a obtener.

Microscopía electrónica de barrido.

Se utilizó el microscopio electrónico de barrido VEGA3 SBU (TESCAN) para observar la superficie del hueso frontoparietal y lagunas osteocíticas. Se trató hueso seco con EM ACE200 (LEICA) Vacuum Coater antes de adquirir imágenes en el MEB. Estas fueron procesadas con Fiji usando las herramientas Polygon y Segmented lines. Data obtenida fueron analizadas en GraphPad Prism 8.0.1, realizando el test de normalidad D'Agostino & Pearson, además de los test no paramétricos Krustal-Wallis y Kolmogorv-Smirnov.

Hibridación *in Situ*:

Se realizó Hibridación *in Situ* de reacción en cadena (In situ hybridization chain reaction-HCR) en tejido óseo siguiendo el protocolo de Molecular Instruments (© 2025 Molecular Instrument).

Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente, a no ser que se indique lo contrario.

Para lavados e incubaciones, se usó 500ul de solución en agitación constante, a no ser que se indique lo contrario.

Preparación de calvaria de *Xenopus laevis*.

Tras extraer la calvaria, procurando dejar un extra de cartílago rodeando el hueso, se transfirieron a un tubo Eppendorf de 600 uL con fijador MEMFA por 1 hora. Transcurrido el tiempo, la muestra debió lavarse 3 veces con PBST por 5 min. cada vez, luego, fue lavada 3 veces con MeOH por 5

min. cada vez. Tras esto, fueron incubadas en MeOH por 2 horas a temperatura ambiente y/o almacenadas a -20 °C. hasta su uso.

Día 1.

Se parte rehidratando la muestra en serie con lavados de MeOH/PBST (75% MeOH/25% PBST; 50% MeOH/50% PBST; 25% MeOH/75% PBST; y 3 veces 100% PBST) por 5 min. cada vez. Luego, se trata el tejido con 2 µg/µL de proteinasa K **solo** por 3 min. Lavar el exceso 3 veces con PBST 1X durante 5 minutos cada vez. Se continuó agregando 500 µL de bleach solution ubicando las muestras bajo luz brillante (se revisó constantemente hasta que la muestra haya sido decolorada lo suficiente). Luego, fue lavada 2 veces con 0.1 M TEA por 5 min. cada vez. Le siguió un lavado de 5 minutos en una solución recién preparada de 25 µL de anhídrido acético en 10 mL de 0.1 M TEA, y otro lavado de 5 minutos en una solución también recién preparada de 50 µL de anhídrido acético en 10 mL de 0.1 M TEA. Se lavó 2 veces con PBST por 5 min. cada vez. Tras esto, se debió re-fijar en MEMFA por 20 minutos, y lavar 3 veces con PBST por 5 min. cada vez. Siguió dejar incubando la calvaria por 5 min. en hielo en una solución de 50% PBST/50% 5x SSCT, luego, también en hielo, incubar en 5x SSCT por 5 min. Después, incubar en 500 µL de hybridization buffer por 5 min. en hielo.

Fase de detección.

Pre-hybridizar la muestra en 500 µL de Probe Hybridization buffer por 30 min a 37 °C. A la vez, preparar probe solution agregando 2 pmol de cada probe set (*e.g.* 1 µL del stock de 1 µM) a 250 µL de Hybridization Buffer a 37 °C. Una vez transcurridos los 30 min., se removió la Pre-hybridization solution y agregó la Probe solution, y se dejó incubar la muestra durante 12-16 hrs a 37 °C.

Día 2

Se removió el exceso de sonda lavando la muestra 4 x 15 min. con 500 µL de Probe Wash Buffer a 37 °C. Luego, se lavó el tejido con SSCT 5X 2 veces por 5 min. a temperatura ambiente.

Fase de amplificación.

Se preparó en tubos individuales 6pmol de hairpin h1 y 6 pmol de hairpin h2 enfriando rápidamente 2 µL del stock de 3 µM (calentar a 95°C por 90 segundos y luego dejar enfriar a temperatura ambiente en oscuridad por 30 minutos. Mientras tanto, se pre-amplificó la calvaria con 500µL de

Amplification Buffer por 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se preparó la solución de hairpins añadiendo los hairpin h1 y h2 que pasaron por el enfriamiento rápido, a 100 µL de Amplification Buffer a temperatura ambiente. Luego, se removió la solución de pre-amplificación y se agregó la solución de hairpins. Se dejó incubando la muestra durante la noche (12–16 horas) en oscuridad y a temperatura ambiente.

Día 3

Se removió el exceso de hairpins con una serie de lavados con 5x SSCT (dos lavados de 5 min. cada uno; dos lavados de 30 min. cada uno. En el Segundo lavado, se diluyó DAPI 1:500 en SSCT para observar núcleos; y le siguió 1 lavado por 5 min).

Se finalizó con 3 lavados en PBS. Las muestras fueron montadas en Dako (Sigma-Aldrich) y almacenadas a 4 °C.

Las imágenes fueron obtenidas en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA-Biobio) de la Universidad de Concepción, en el Microscopio de láser multifotónico invertido (Zeiss LSM 780), y en lupa de epifluorescencia APOTOME a 647nm.

RESULTADOS

Diferentes dinámicas de osificación y expresión de genes en *X. laevis* y *X. tropicalis*.

Habiendo detectado preliminarmente una divergencia en la expresión de *tfap2b*, quisimos analizar la expresión de otros genes conocidos por regular la tasa de diferenciación de mesénquima a osteoblastos y, por lo tanto, la dinámica de cierre craneal (Liang et al., 1915; Satokata et al., 2000; Timberlake et al., 2019, Murakami et al., 2024). Buscamos diferencias de expresión osteogénica entre los genomas *X. laevis*.L (*XIL*), *X. laevis*.S (*XIS*) y *X. tropicalis* (*Xt*) (**Fig. 5A**). Estos valores fueron obtenidos a partir de RNA-Seq y normalizados como transcritos por millón (TPM). En ambos subgenomas de *Xla* el gen *twist1* presenta un alza de su expresión en osteoblastos en comparación al tejido mesenquimático, mientras que su contraparte de *Xtr* mantiene una expresión similar en ambas muestras (**Fig. 5A**). Además, descubrimos que los genes *msx1*, *msx2* y *zic1* cuentan con una disminución de su expresión en osteoblastos de *Xla*, contrario al aumento observable en *Xtr*. Al igual que *runx2* y *tfap2b*, *msx* y *zic1*, que son marcadores característicos de células de cresta neural, responsables de formar el cráneo y otras estructuras en los vertebrados (Shimeld & Holland, 2000) estarían actuando como reguladores positivos de la osificación en el hueso frontoparietal, favoreciendo el depósito de matriz ósea por medio de osteoblastos, mientras que, *twist1* actúa como regulador negativo al reprimir la diferenciación a osteoblastos desde las células mesenquimales y por tanto, retrasando la osificación en *Xla*.

Entre *Xla* y *Xtr* la dinámica opuesta de expresión de genes involucrados en la patología craneosinostosis es muy llamativa y sugiere que puede haber diferencia en el patrón de osificación craneal entre ambas especies. Por este motivo, se monitoreó el crecimiento del hueso frontoparietal para ambas especies a partir del estadio NF54, esto por medio de una doble tinción en calvarias de *Xla* y *Xtr* con Alizarin red, utilizado para marcar el hueso inicial con rojo, y Calcein green, para observar en verde el hueso nuevo que se haya formado al transcurrir 10 días (**Fig. 5B**). El cierre completo de la calvaria ocurre en estadios diferentes, siendo NF60 para *Xla* y NF59 para *Xtr*, exponiendo una diferencia en la temporalidad del desarrollo de este hueso. Además, se observó que *Xtr* cuenta con una menor superficie que *Xla* (**Fig. 5B**).

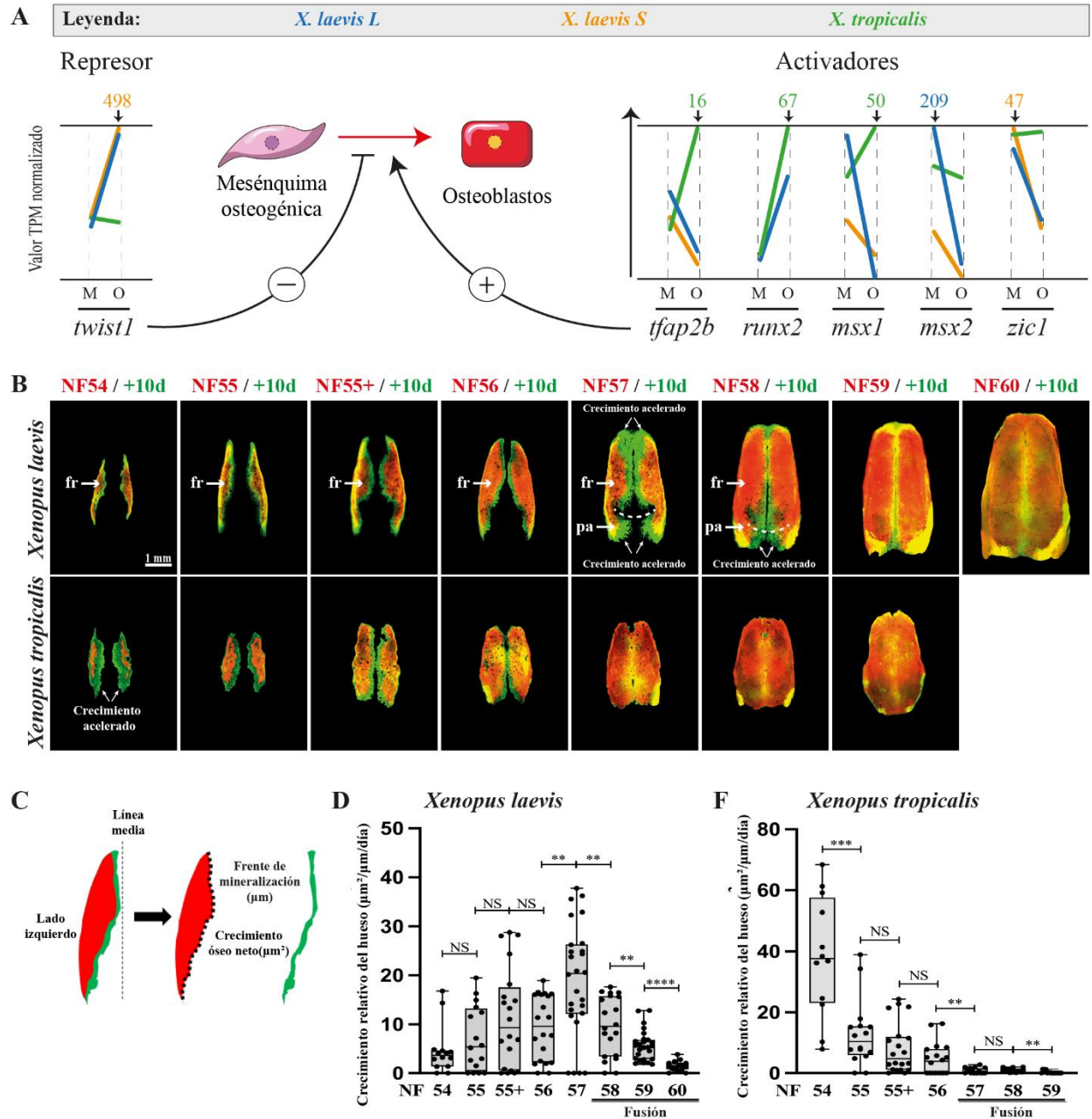


Figura 5: Comparado a *Xla*, *Xtr* demuestra una condición fenotípica y genética similar a craneosinostosis. (A) Niveles de expresión de genes relacionados a craneosinostosis normalizados con valores TPM para mesénquima (M) y osteoblastos (O), para los genomas *XIL* (Azul), *XIS* (Naranja) y *Xt* (Verde). Todos los diagramas fueron ajustados a la misma altura, el mayor valor de TPM se señala con flechas. Los colores morado y verde reflejan una mayor expresión/actividad en *Xl* y *Xt*, respectivamente. **(B)** Monitoreo de crecimiento óseo realizado en *Xla* (arriba) y en *Xtr*

(abajo) al sumergir larvas vivas en una solución de Alizarin red (rojo) en el estadio indicado, y en una solución de Calcein green (verde) 10 días después. Se evidencian zonas Alizarin red-negativas/Calcein green-positivas indicando un rápido crecimiento. Líneas discontinuas marcan los remanentes evolutivos de la sutura coronal de *Xla*, la cual separa parcial y transitoriamente los huesos frontal (fr) y parietal (pa). (C) Dibujo ilustrativo del lado izquierdo de una calvaria NF56 *Xla*, demostrando cómo la distancia del frente de mineralización (línea punteada) y el crecimiento óseo neto de la superficie (área de zonas Alizarin red-negativas/Calcein green-positivas) fueron medidas. (D, F) Cuantificación de la tasa de crecimiento óseo relativo para el hueso frontoparietal de *Xla* (C) y *Xtr* considerando el crecimiento óseo neto normalizado por el frente de mineralización por el número de días. Se indica, en estadios más avanzados, la fusión entre los lados derechos e izquierdos al nivel de la línea media del hueso frontoparietal. **** $P < 0.0001$; *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; ns $P > 0.05$

En **Fig. 5C** se indica con un esquema el método por el cual se consiguió cuantificar la tasa de crecimiento relativa del hueso para *Xla* (**Fig. 5D**) y *Xtr* (**Fig. 5F**). Analizando el gráfico de **Fig. 5D**, observamos que para *Xla* hay un crecimiento pausado en las primeras etapas, alcanzando su máximo en NF57 para prontamente volver a disminuir debido a la fusión de ambos huesos en la línea lateral. En *Xla* se observan zonas de fusión entre ambos extremos del hueso en NF57-NF58, estadios en los cuales se logra identificar lo que sería remanentes evolutivos de una sutura coronal (**Fig. 5B**, líneas discontinuas), que separa parcialmente y transitoriamente el hueso frontal (fr) del parietal (pa). Por el contrario, *Xtr* cuenta con un crecimiento notablemente acelerado desde el inicio de la formación del hueso frontoparietal que disminuye abruptamente de NF54 a NF55, luego creciendo paulatinamente hasta cerrarse por completo en NF59, si bien ya se encuentra significativamente fusionado a partir de NF57.

Disposición de fibras de colágeno en hueso frontoparietal de *X. laevis* y *X. tropicalis*.

Como primer paso para examinar si distintas dinámicas de cierre craneal pueden impactar la organización de la matriz ósea, se realizaron cortes histológicos transversales del hueso ya cerrado, y por medio de microscopia de 2-fotones se visualizó el aspecto de las fibras de colágeno en cortes transversales de *Xla*-NF60 y *Xtr*-NF59 (**Fig. 6**). En **Fig. 6A** se pueden observar fibras paralelas y

organizadas en comparación a las fibras de *Xtr* con láminas irregulares (**Fig. 6B**). De igual forma, la apariencia de la matriz es más fina, con un crecimiento uniforme en *Xla*, mientras que en *Xtr* el tejido se aprecia más grueso y menos homogéneo. Adicionalmente, es de mencionar que en la superficie del hueso de *Xla* se pueden identificar células de osteoblastos, y, por el contrario, en *Xtr* hay una aparente mayor presencia de lagunas osteocíticas en la matriz.

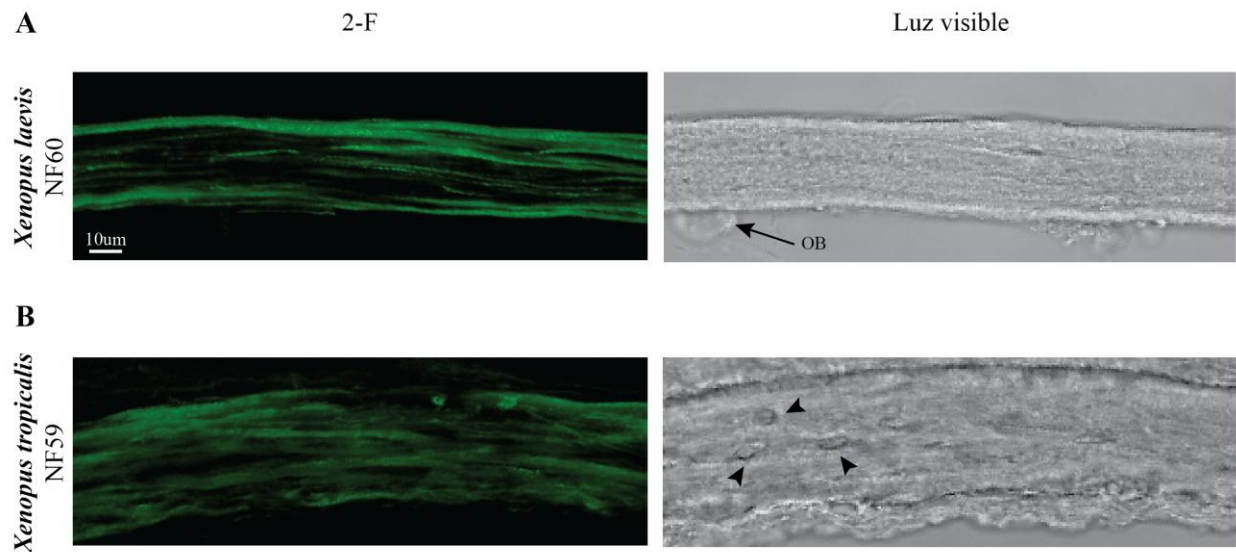


Figura 6. Microscopía de excitación de dos fotones de calvaria de *Xla* y *Xtr*. Visualización de colágeno utilizando un láser pulsado multifotónico a 800 nm en cortes de hueso frontoparietal (2-F, dos fotones, paneles de la izquierda), así como su observación por luz blanca (paneles de la derecha). (**A**) Se detectó el colágeno en el tejido óseo craneal de *Xla*, el cual se constituye en fibras paralelas y organizadas, finas en comparación al hueso de (**B**) *Xtr*, más desorganizado y grueso. Además, parece ser que *Xla* aún cuenta con osteoblastos (flecha) en la superficie con el hueso ya cerrado en NF60, mientras que en *Xtr*, se observan abundantes lagunas osteocíticas (puntas de flecha) en NF59.

Una aproximación a la osteocitogénesis de *X. laevis* y *X. tropicalis*.

Nuestra observación anterior sugiere una mayor presencia de osteocitos en *Xtr* (**Fig. 6B**). Esto, combinado a cambios de expresión en *phosphol* (**Fig. 4**) nos incitó a examinar el proceso de osteocitogénesis en mayor detalle. Mediante microscopía electrónica de barrido se estudió de forma detallada la superficie del hueso frontoparietal de *Xla* y *Xtr* en calvaria de individuos jóvenes metamorfoseados NF66. En **Fig. 7A-A'** se visualizan zonas con el panorama general respecto a las lagunas osteocíticas de ambas especies, que en primera instancia parecían de mayor tamaño, más circulares y menos abundantes en *Xla* que en *Xtr*, cuyas lagunas presentaban una morfología más elongada y fina, lo cual es correspondiente con lo reportado en (Muñoz et al., 2018). Estas suposiciones fueron revisadas (**Fig. 7E**) cuantificando el número de lagunas por mm² en lagunas iniciando su formación, completamente abiertas, y aquellas cerrando, es decir, ya siendo cubiertas por matriz ósea, además, se examinó el área, perímetro, largo y circularidad de las lagunas abiertas en ambas especies. En **Fig. 7B-C-D** y **Fig. 7B'-C'-D'** se observa un acercamiento a lagunas osteocíticas representativas en formación (I) totalmente abierta (A) y ya cerrando (C). Finalmente, se comprobó que para *Xtr* hay mayor abundancia de lagunas osteocíticas de estas tres formas mencionadas, prácticamente duplicando la cantidad de *Xla* para cada caso. Por otro lado, las lagunas abiertas de *Xla* son de mayor tamaño a *Xtr*, y poseen una mayor área (*Xla* ~200um²; ~*Xtr*100um²), perímetro (*Xla* ~55um; *Xtr* ~35um) y largo (*Xla* ~20um; *Xtr*~15um). Respecto a la circularidad, si bien hubo tendencia a una morfología tipo cilíndrica, una vez revisado el parámetro “circularidad” no se encontró mayor significancia en los datos (*P≤0.05) (**Fig. 7E**).

Contando con estas observaciones, se decidió examinar la data RNA-Seq (**Fig.7F**) encontrando altos niveles de expresión para *hif1a* y *phosphol* tanto en *Xla* como en *Xtr*, los cuales estarían participando en la diferenciación a osteocitos. Además, se descubrió una baja diferencial en la expresión de *phd2* en *Xtr*, el cual es un regulador importante para la adaptación de las células a ambientes bajos en oxígeno, como lo es el osteocito (Li et al., 2019). Por otro lado, el gen *enpp1*, que se conoce tradicionalmente tiene una alta expresión en tejido óseo (Roberts et al., 2019), también posee una baja expresión en *Xtr*, lo cual se ha asociado previamente a una disminución del tamaño de las lagunas osteocíticas (Hajjawi et al., 2014) equivalente a lo documentado para *Xtr* en esta tesis.

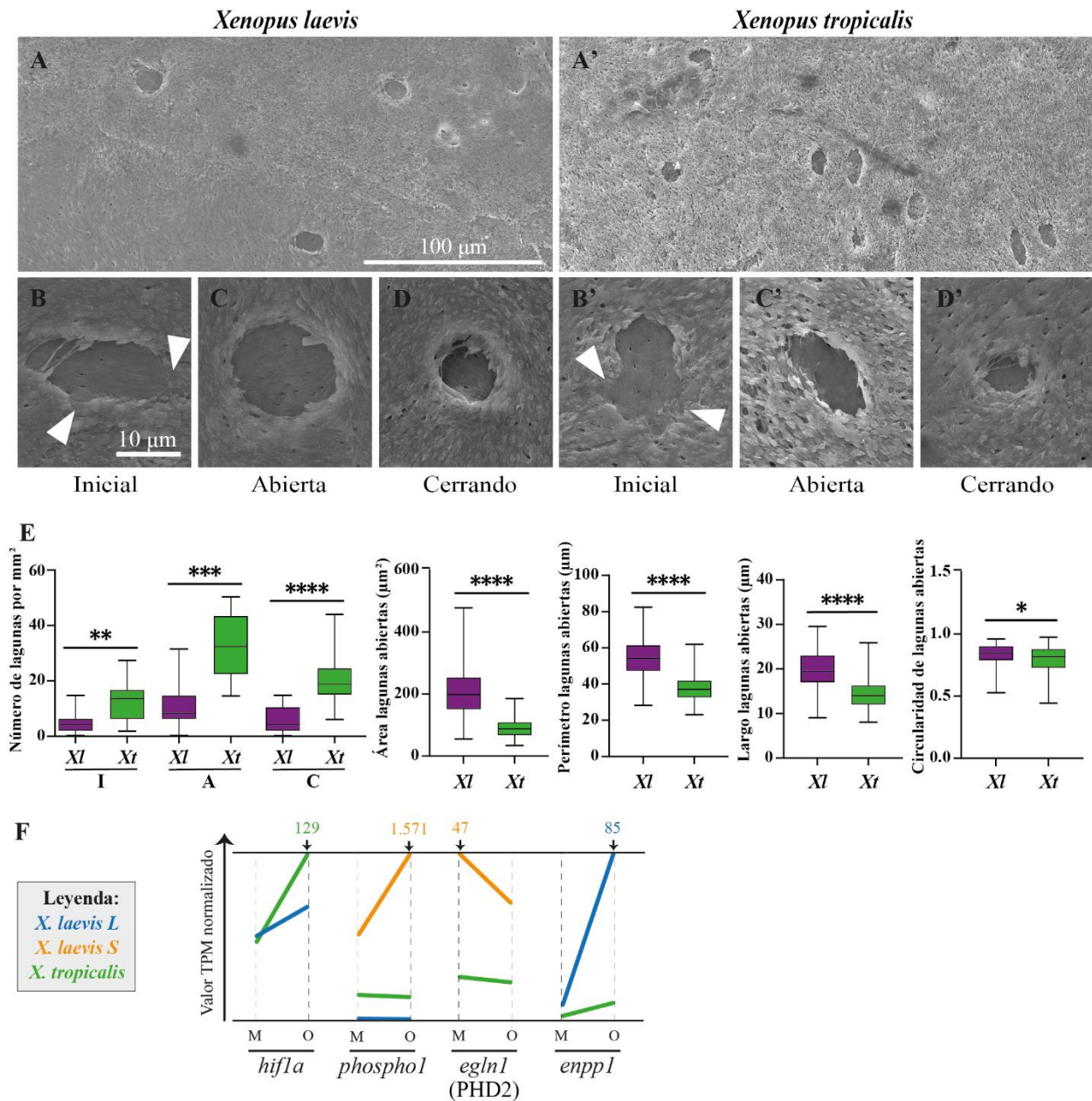


Figura 7: Divergencia en osteocitogénesis. (A-A') Microscopía electrónica de barrido sobre la superficie del hueso para *Xla* (C, etapa NF60) y para *Xtr* (C', etapa NF59). Mayor magnificación para *Xla* (B-D) y *Xtr* (B'-D') muestran lagunas osteocíticas en su momento de iniciación ("inicial", B, B'), intermedio ("abierta", C, C') y tardío ("cerrando", D, D'). Puntas de flecha blanca apuntan a los bordes de las lagunas iniciales que no están bien definidas y aún conectadas a la matriz de hueso que les rodea. La barra de escala en (A) aplica para (A') y la barra de escala en (B) aplica para (C, D, C', D'). (E) Cuantificación de los parámetros indicados para ambas especies. Abreviación: I, inicial; A, abierta; C, cerrando. (F) Niveles de expresión de *hifla*, *phosphol*, *egln1*

(*PHD2*) y *enpp1*. Valores de TPM normalizados (NTPM) son mostrados para mesénquima (M) y osteoblastos (O), y para los genomas *XtL* (azul), *XtS* (naranja) y *Xt* (verde). El diagrama fue ajustado a la misma altura, y el mayor valor de NTPM es indicado con flechas. **** $P < 0.0001$; *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$.

Participación de genes de colágeno no tradicionales en el depósito de matriz ósea.

Hasta ahora, nuestros resultados revelan una diferencia en la dinámica de osificación, así como en el proceso de osteocitogénesis. Además, nuestra data preliminar reveló un sorprendente aumento de la expresión del gen *col2a1* tradicionalmente asociado al tejido cartilaginoso. Después de realizar un análisis exhaustivo de los genes involucrados en deposición de matriz de colágeno en nuestros datos de RNA-Seq, encontramos dos genes adicionales expresados más fuertemente en *Xla* que en *Xtr* y que decidimos investigar en mayor detalles: por una parte, *col18a1*, por el motivo que se ha asociado a endotelios y nunca a hueso (Khoshneviszadeh et al., 2024) y, por otra parte, a *pcolce*, un gen fundamental para la maduración del colágeno y además activado por *twist1* (ver Fig. 5 y (Bildsoe et al., 2016; Sansilvestri-Morel et al., 2021). Mediante Hibridación *in Situ* HCR, se revisó espacio-temporalmente la expresión de *col2a1* (Collagen Type II Alpha 1), *col18a1* (Collagen Type XVIII Alpha 1) y *Pcolce* (Procollagen C-Endopeptidase Enhancer) con los homólogos *col2a1.S*, *col18a1.L* y *pcolce.L* en calvaria completa durante los estadios NF56, NF58 y NF59 (**Fig. 8**, **Fig. 9**, **Fig. 10**) al identificar un aumento de expresión de estos genes en las células de osteoblastos en al menos uno de los subgenomas de *Xla* (**Fig. 8A**, **Fig. 9A**, **Fig. 10A**). Al ser un gen tradicionalmente asociado a la producción de cartílago, contando con una alta expresión en condrocitos, se probó primeramente la sonda de *col2a1.S* en las extremidades inferiores de larva de *Xla*, a fin de comprobar la efectividad de la misma (**Fig. 8B**). Como era de esperarse, apreció una fuerte expresión a nivel de epífisis, confirmado la expresión en una zona de cartílago proliferativo (Miura et al., 2008). En **Fig. 8C-D-E** se observan imágenes merge de DAPI-*col2a1.S* de la superficie completa del hueso frontoparietal, las cuales fueron diseccionadas cuidadosamente dejando un borde de cartílago a su alrededor en el cual se expresa fuertemente *col2a1.S*, sirviendo como control positivo. También se incluyen acercamientos a zonas de Hueso-Mesénquima, y Hueso-Mesénquima-Cartílago; las imágenes exponen que la mayor expresión de mRNA es en cartílago, y, frecuentemente, mayor en hueso que en mesénquima.

Igualmente, se revisó la expresión de *coll8a1*.L, cuyo gen tiene papel en las membranas basales del epitelio (Seppinen & Pihlajaniemi, 2011). Si bien su expresión es tan solo de 153TPM en osteoblastos, se logró identificar con éxito en hueso mineralizado (**Fig. 9B**). Además, se realizaron acercamientos a zonas de transición Hueso-Mesénquima (**Fig. 9C-D-E**), donde no se encontró marcaje en el tejido mesenquimático, por lo cual la expresión de este parece estar relegada a osteoblastos. Se aprecia señal en lo que parecen ser vasos sanguíneos (señalados con asterisco -*) lo cual es consistente con la literatura, ya que se ha descrito con una abundante presencia en membranas basales vasculares (Muragaki et al., 1995).

Por último, se inspeccionó de forma exploratoria a *pcolce*.L, cuya proteína (PCOLCE1) es un regulador clave de la fibrillogénesis (Lagoutte et al., 2021). Su nivel de expresión en osteoblastos (9028 TPM), resultó ser tan fuerte que, al probar la sonda en la calvaria, aún se distinguía el marcaje al observarlo con un aumento menor (**Fig. 10C-D**). Interesantemente, la expresión no parece ser pareja a lo largo del frente de mineralización; cuyo borde posee múltiples zonas de sobreexpresión (**Fig. 10B**), las cuales resultas atractivas para estudiar a la posteridad, al ser una zona y comportamiento en los que no se ha estudiado previamente.

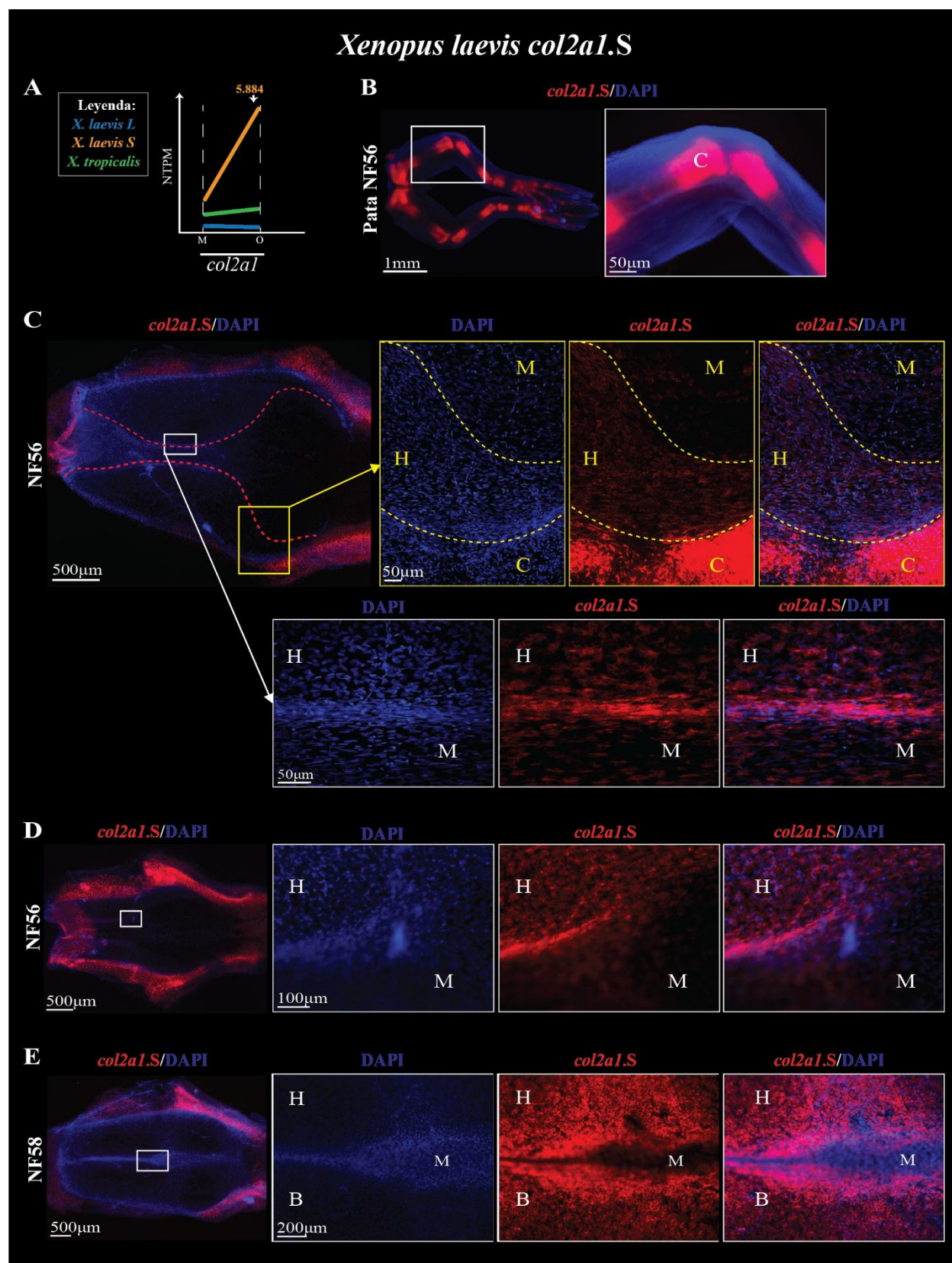


Figura 8.

Figura 8: Hibridación *in Situ*-HCR de *col2a.S* en hueso frontoparietal y pata juvenil de *Xla*.

(A). Niveles de expresión de *col2a1*. Valores de TPM normalizados (NTPM) son mostrados para mesénquima (M) y osteoblastos (O), y para los genomas *Xll* (azul), *Xls* (naranja) y *Xt* (verde). El diagrama fue ajustado a la misma altura, y el mayor valor de NTPM es indicado con flechas. **(B)** Microscopía confocal en pata cartilaginosa de larva de *Xl* mostrando la expresión de *col2a1.S*, con una zona de aumento señalada por recuadro blanco. **(C)** Microscopía confocal de calvaria completa NF56, el hueso en crecimiento está delimitado por líneas punteadas rojas. En el recuadro amarillo se observa una zona con cartílago (C), hueso (H) y mesénquima (M), delimitadas por líneas punteadas amarillas. El recuadro blanco representa un acercamiento a una zona de transición M-H en el frente de mineralización, mostrando el RNAm expresando *col2a1.S* tanto en células de osteoblastos como mesenquimales. **(D)** Imagen obtenida con lupa de fluorescencia Apotome de calvaria completa en estadio NF56, el recuadro blanco representa un acercamiento en zona de transición M-H. **(E)** Imagen obtenida con lupa de fluorescencia Apotome de calvaria completa en estadio NF59, el recuadro blanco representa un acercamiento en zona H-M-H, con el hueso casi cerrado por completo.

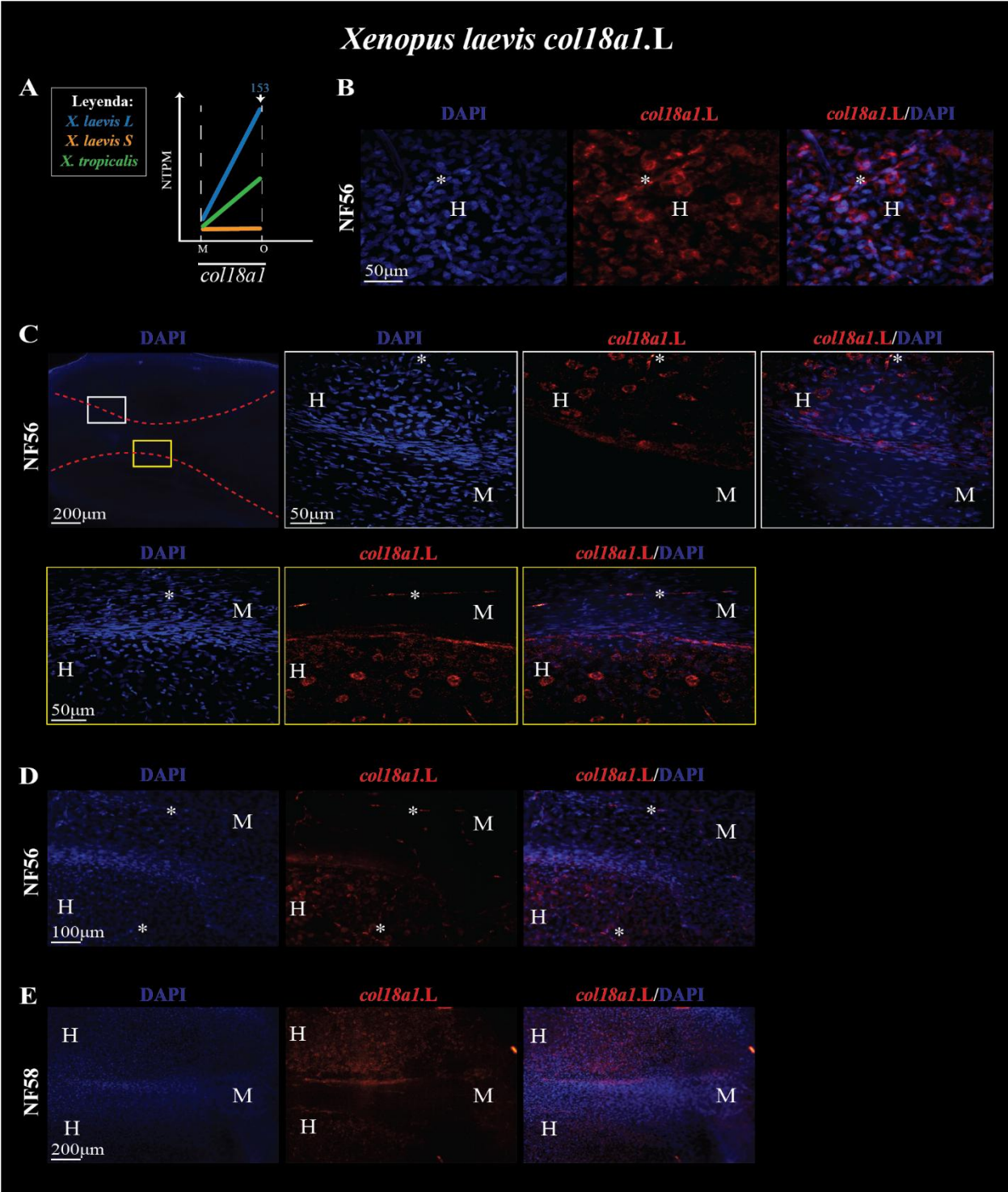


Figura 9.

Figura 9: Hibridación *in Situ*-HCR de *coll8a1.L* en hueso frontoparietal. (A). Niveles de expresión de *coll8a1.L*. Valores de TPM normalizados (NTPM) son mostrados para mesénquima (M) y hueso (H), y para los genomas *Xt* (azul), *Xls* (naranja) y *Xt* (verde). El diagrama fue ajustado a la misma altura, y el mayor valor de NTPM es indicado con flechas. **(B)** Microscopía confocal en una zona osificada del hueso frontoparietal, mostrando el ARNm expresando *coll8a1.L* en osteoblastos de *Xt*. **(C)** Microscopía confocal de calvaria completa NF56 con marcador de núcleos DAPI, la zona osificada está delimitado por líneas punteadas rojas. Los recuadros blancos y amarillos corresponden a acercamientos a zonas de transición M-H en el frente de mineralización. Se aprecia el marcaje de *coll8a1.L* en células de osteoblastos como en vasos sanguíneos **(D)** Imagen obtenida con lupa de fluorescencia Apotome en una zona representativa de calvaria NF56 para M-H. **(E)** Imagen obtenida con lupa de fluorescencia Apotome de calvaria en estadio NF58, en zona H-M-H. Vasos sanguíneos son señalados con asterisco (*).

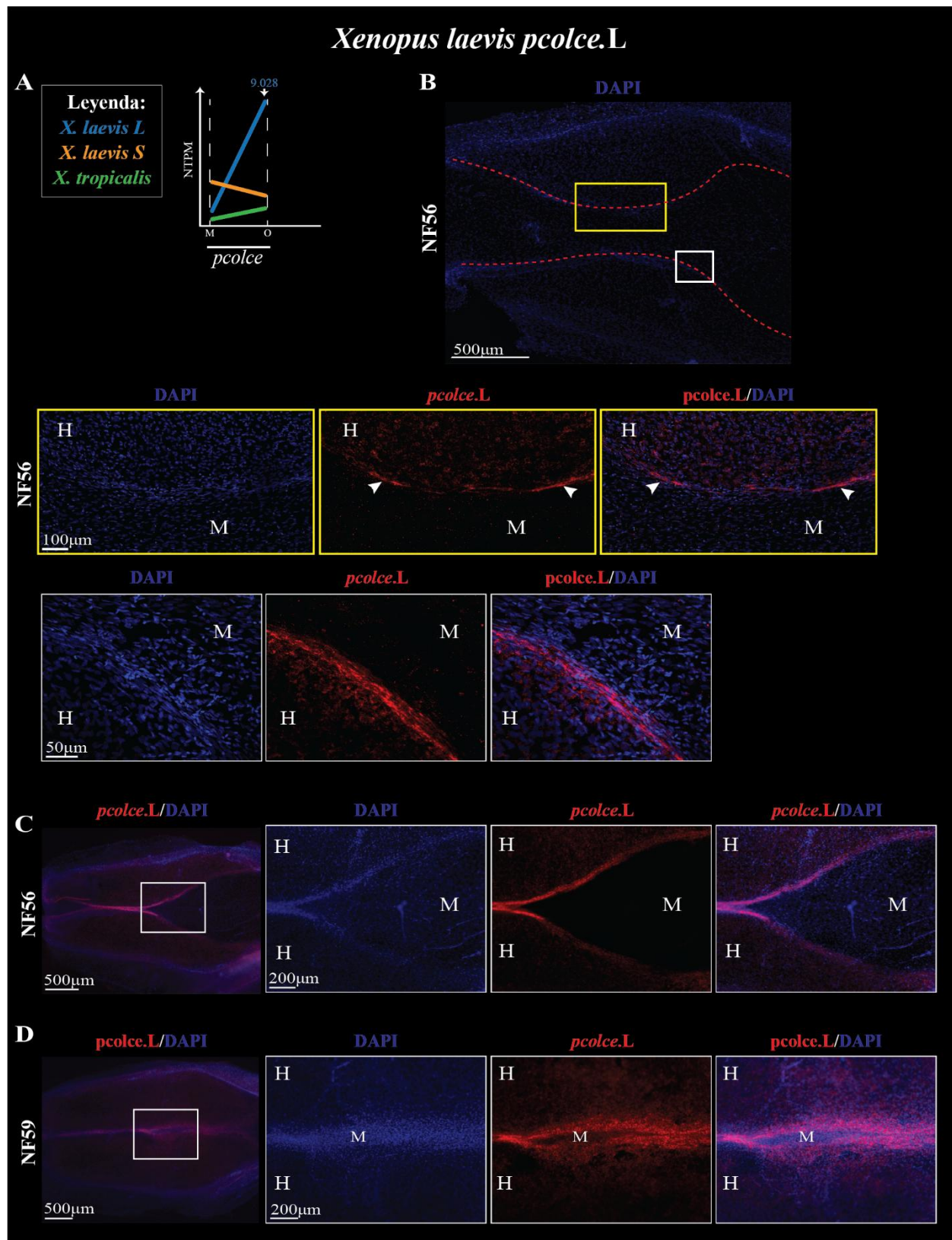


Figura 10.

Figura 10: Hibridación *in Situ*-HCR de *pcolce.L* en hueso frontoparietal. (A). Niveles de expresión de *pcolce*. Valores de TPM normalizados (NTPM) son mostrados para mesénquima (M) y hueso (H), y para los genomas *XtL* (azul), *XtS* (naranja) y *Xt* (verde). El diagrama fue ajustado a la misma altura, y el mayor valor de NTPM es indicado con flechas. **(B)** Imagen obtenida con lupa de fluorescencia Apotome en calvaria completa NF56 con marcador de núcelos DAPI, la zona osificada está delimitado por líneas punteadas rojas. El recuadro amarillo representa un tile obtenido con microscopía confocal en el frente de mineralización. Se observan zonas con mayor expresión de *pcolce* señlas con punta de flecha. El recuadro blanco representa un aumento en una zona de transición M-H. **(C)** Imagen merge de DAPI-*pcolce* obtenida con lupa de fluorescencia Apotome de calvaria completa en estadio NF56, el recuadro blanco representa un acercamiento en zona H-M-H, con alta expresión de *pcolce.L* en hueso, y casi nula en mesénquima. **(D)** Imagen merge de DAPI-*pcolce* obtenida con lupa de fluorescencia Apotome de calvaria completa en estadio NF59, el recuadro blanco representa un acercamiento en zona H-M-H, con el hueso en etapa de cierre final.

DISCUSIÓN

¿Divergencia evolutiva? Regulación genética diferencial provoca patrones óseos independientes entre *X. laevis* y *X. tropicalis*.

Para comparar el hueso frontoparietal de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* se realizó un acercamiento morfológico y data transcriptómica. Entre los hallazgos principales, se observó que *Xtr* parece haber sufrido de una simplificación craneal mayor a la que experimenta *Xla* que, por su lado, aún cuenta con remanentes de una sutura coronal, lo que es también evidente en otros anfibios evolutivamente más distantes *Rhinella spinulosa* (Mundaca et al., 2024). Las tasas de osificación entre ambas especies son opuestas, lo que se condice con la expresión en genes osteogénicos que podrían estar moldeando sus patrones de crecimiento. Por ejemplo, la disminución de expresión del conjunto de genes de carácter pro-osteogénico en las células productoras de matriz ósea en *Xla tfap2b*, *msx1*, *msx2* y *zic1* (**Fig. 5A y Fig. 5D**) se relacionarían con las diferencias de temporalidad en el cierre craneal entre ambas especies. De igual manera es interesante la evolución de la expresión de *twist1*, un gen clave que regula el desarrollo de tejido mesenquimal de la zona craneofacial (Bildsoe et al., 2013); siendo un inhibidor osteogénico cuya pérdida de función se asocia a un fenotipo de craneosinostosis en mamíferos (Chen & Behringer, 1995; Howard et al., 1997). Ahora, la data de RNA-Seq de nuestro laboratorio respecto a la “sobrexpresión” de *twist1* en *Xl* no es una dinámica esperable al compararla con data humana donde este gen se apaga durante la diferenciación (To et al., 2024). Sin embargo, se asocia a lo descrito para pez cebra por (Farmer et al., 2024), que hallaron una fuerte expresión de *twist1* en células de la sutura coronal. De forma análoga, el fenotipo de *Xt* (**Fig. 5B**, inferior) es muy similar a la de su mutante generado *twist1b^{-/-};tcfl2^{-/-}* que exhibían un crecimiento óseo desproporcionado en las zonas correspondientes a la sutura coronal, con un fenotipo final de craneosinostosis. Esto, sumado a la baja expresión de *twist1* en *Xtr*, comparativamente a *Xla*, indicaría que esta especie sufre de un fenómeno similar a esta malformación craneal.

Por otro lado, nuestra data permite proponer un modelo para explicar la existencia de un remanente transitorio de la sutura coronal en *Xla*, específicamente en los estadios NF57 y NF58 (**Fig. 5**, superior). Si bien las suturas craneales han desaparecido en el género *Xenopus* (Roček et al., 2015) proponemos que el mesénquima craneal ha mantenido una red de regulación genética típicamente activa en suturas en peces y mamíferos e involucrada en la mantención de osteoprogenitores. En resumen, demostramos que cambios concertados en genes independientes como *twist1*, *tfap2b*,

msx1, *msx2* y *zic1* son coherentes con las tasas de cierre craneal opuestas entre *Xla* y *Xtr*, representando un ejemplo más que evolución y patologías humanas frecuentemente comparten bases genéticas (Katikaneni & Lowe, 2025; Meadows & Lindblad-Toh, 2017).

Biología del osteocito en la matriz de hueso.

Tras analizar la estructura de la matriz colagenosa por medio de microscopía 2 fotones (**Fig. 6**), se puede razonar que *Xtr* despliega un aspecto similar al hueso de tipo “woven”, el cual contiene mayor cantidad de osteocitos que el hueso lamelar (Hernandez et al., 2004) y se forma tempranamente con un depósito de colágeno sin orientación aparente, mientras que *Xla* puede asociarse a un hueso de tipo lamelar, característico por sus fibras de colágeno dispuestas paralelamente (Shapiro & Wu, 2019). Es necesaria una mayor profundización y cuantificación de distintos posibles análisis con respecto a estos hechos, sin embargo, como aproximación inicial se pueden asociar a la biología propia de ambos organismos, con *Xtr* priorizando una metamorfosis rápida, necesitando prescindir de su etapa larval con mayor velocidad que *Xla*.

Es relevante destacar que Currey (2003) describe que los osteocitos son “atrapados” en la matriz ósea más lentamente en hueso de tipo lamelar, y que poseen una morfología más redondeada. Esto coincide con lo observado en la superficie del hueso frontoparietal en *Xla* (**Fig. 7C-E**). Por otro lado, la abundancia de lagunas en *Xtr* (**Fig. 7C'-G**) podría deberse a este abrupto crecimiento óseo que experimenta la especie (**Fig. 5F**), donde una gran cantidad de osteoblastos inicialmente catalizarían la producción de hueso para ser embebidos en medida que la matriz se deposita rápidamente. Para estas células, si bien especializadas para el ambiente desafiante que habitan, se ha descrito que la delección específica de *phd2* en osteocitos incrementa la masa ósea, lo cual resulta en una acumulación nuclear de *hif1a* (Stegen et al., 2018). ¿Esto qué quiere decir?, que el silenciamiento de *phd2* conlleva la activación de las señales de hipoxia con el aumento de *hif1a*, al igual que la expresión en *Xtr* (**Fig. 7F**). El análisis SEM para *Xtr* también arroja información similar a la observada por Hajjawi et al., 2014 en ratón, encontrando una reducción en el área y diámetro de las lagunas osteocíticas en mutantes *enpp1*^{-/-}. Por otro lado, Javaheri et al., 2015 describe que la deficiencia de *phospho1* provoca un aumento en la cantidad de lagunas osteocíticas y de vasos sanguíneos. Ambos resultados respecto a la forma y cantidad de lagunas concuerdan con la data RNA-Seq del laboratorio donde los niveles de expresión de *enpp* y *phospho1* en *Xtr* se encuentran bajos (**Fig. 7F**). En resumen, estos resultados, se alinean favorablemente con la data

RNA-Seq para osteoblastos de ambas especies, y la expresión de los genes *hif1a*, *phosphol*, *phd2* y *enpp1* se logran relacionar con diferencias en la osteogénesis entre ambas especies.

Análisis espacio-temporal de genes de colágeno en hueso frontoparietal de *X. laevis* y *X. tropicalis*.

A lo largo de esta tesis se han detectado notorias diferencias en el crecimiento craneal de *Xla* y *Xtr* respecto a los patrones temporales y de crecimiento óseo. El desarrollo de los organismos está sujeto al control de una compleja serie de redes reguladoras de genes, estas actúan principalmente al inicio de la transcripción y pueden conllevar a cambios evolutivos en la anatomía de los organismos (Hart et al., 2018; Hockman et al., 2008). Considerando que las observaciones entre ambas especies hermanas se han enfocado principalmente a los aspectos fenotípicos del hueso frontoparietal y se ha podido relacionar la morfología del hueso con literatura y data RNA-Seq previamente trabajada por el laboratorio, se filtraron minuciosamente genes con expresión diferencial en osteoblastos de *Xla* dentro de los cuales se identificó un par que sugiere que hay una mayor expresión en genes codificadores de proteínas involucrados en la **síntesis** (*col2a1* y *coll8a1*) y **maduración** (*pcolce*) de colágeno en al menos un subgenoma *Xla*, los cuales no han sido previamente relacionados al desarrollo óseo.

Los osteoblastos, al ser las células encargadas de la formación de hueso, secretan proteínas de la matriz extracelular como aquellas de la familia de Colágenos, mayoritariamente Colágeno tipo 1 (Ricard-Blum, 2011) Si bien pertenecen a la misma familia, *col2a1* es un componente fundamental de la matriz de cartílago hialina y se encuentra tradicionalmente durante el desarrollo de elementos con un origen cartilaginoso como las extremidades y vértebra (Cervantes-Díaz et al., 2017). Como se ha mencionado previamente, *col2a1* es considerado como un marcador específico de condrocitos (Zhou et al., 1998), es por ello que se incluyó como control positivo la extremidad posterior sin osificar NF56 de *Xla* en este estudio (**Fig. 8B**). El gen también se expresa en osteoblastos de huesos en desarrollo de peces teleósteos y gar, mas, cuenta con una baja expresión osteoblástica en el tetrápodo *Xtr* y aún menor expresión en ratón, sugiriendo que su transcripción osteogénica se vio reducida en el linaje tetrápodo (Enault et al., 2015; Hilton et al., 2007). Ahora, a pesar de que se ha reportado su expresión en osteoblastos de peces y ratón, no ha sido así en altos niveles de expresión como es el caso presentado en este trabajo con el fuerte marcaje observado en los experimentos de *in Situ* HCR (**Fig. 8C-D-E**). Esto corrobora la data del RNA-Seq, además

de representar un cambio evolutivo importante en los tetrápodos, demostrando que efectivamente este gen fue reclutado en hueso por *Xla*.

Respecto al gen *coll8a1*, este se expresa durante la migración de células derivadas de la cresta neural entérica y se conoce como un inhibidor de la angiogénesis y crecimiento tumoral (Nagy et al., 2018). Sus diferentes isoformas presentan expresión diferencial en tejidos como el hígado, la retina y el riñón (Halfter et al., 1998) y existen homólogos del gen en diversos organismos como *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* y *Gallus gallus*, lo que sugiere que este gen cumple un rol importante en membranas basales del epitelio (Seppinen & Pihlajaniemi, 2011). En vertebrados como el pez cebra, se identificaron distintos enhancers con secuencias conservadas entre teleósteos y mamíferos, cuya expresión se dio principalmente para cartílago en diferentes niveles y tiempos (Kague et al., 2010). En *Xla*, tres variantes del gen igualmente se expresan a diferentes niveles durante diferentes periodos del desarrollo en múltiples tejidos que concuerdan con la data de otros organismos (Elamaa et al., 2002). En base a la literatura revisada, se puede concluir que la sobreexpresión de *coll8a1* durante la osteogénesis de *Xla*, lo cual fue confirmado por medio de *in Situ* HCR (**Fig. 9**), es un evento distintivo de la evolución de la especie, altamente llamativa dado que nunca se ha asociado este gen al desarrollo esquelético.

De igual forma, no hay trabajos previos que describan la expresión de *pcolce* en hueso, que si bien es un gen que se asocia a células de la matriz extracelular, los estudios han sido centrados mayoritariamente a la proteína por un constante interés científico de la homeostasis en la deposición de colágeno y sus implicancias que tiene en enfermedades como la fibrosis (Bourhis et al., 2013; Kessler & Hassoun, 2019; Vadon-Le Goff et al., 2011). En esta tesis, se ha verificado por medio de RNA-Seq e *in Situ* HCR la expresión de este gen de maduración de colágeno en calvaria en desarrollo de *Xla* (**Fig. 10**). Un aspecto a destacar respecto a estos hallazgos es la aparente sobreexpresión en ciertas zonas del frente de mineralización (**Fig.10B**), una zona que no ha sido ampliamente explorada. Finalmente, resulta muy interesante que *pcolce* haya sido reportado como un gen activado por *twist1* (Bildsoe et al., 2016), lo que respalda los resultados obtenidos en esta tesis respecto a la alta expresión de ambos genes en *Xl*. Según esto, es posible proponer como modelo que cambios en genes de craneosinostosis hayan impactado no solamente la dinámica de cierre craneal, pero también la composición misma de la matriz ósea.

CONCLUSIÓN

A lo largo de este trabajo se examinaron las diferencias en la formación del hueso frontoparietal de *Xla* y *Xtr*, considerando que la primera es producto de un evento de hibridación (hace 17ma) que provocó la duplicación de su genoma, y la segunda es una especie diploide (48ma). Los resultados revelan una tasa de crecimiento relativa distintiva para ambas especies en el hueso frontoparietal, con un crecimiento altamente acelerado en el inicio de su osteogénesis en *Xt* que termina presumiblemente con un fenotipo similar al de craneosinostosis, con el rápido cierre de la calvaria y un tamaño final menor al de *Xla*, cuyo desarrollo parte lentamente e incluso se llega a apreciar un remanente de sutura coronal. Esto coincide con la expresión opuesta en ambas especies de los genes *tfap2b*, *twist1*, *msx1* y *zic1*, todos involucrados en craneosinostosis en humanos. Por otro lado, se analizó la superficie del hueso encontrando diferencias en la densidad y forma de las lagunas osteocíticas, hallándose una mayor cantidad, pero de menor tamaño en *Xtr* que en *Xla*, lo que estaría siendo impulsado por la expresión diferencial de genes reguladores de la osteocitogénesis como *hif1a*, *phospho1*, *phd2* y *enpp1*. Como última aproximación para comprender las variaciones osteogénicas de la calvaria, se utilizó un acercamiento transcriptómico en base a hibridación *in Situ* HCR para los genes *col2a1*, *col18a1* y *pcolce*, genes de colágeno codificados por *Xla* que anteriormente no se han asociado a la matriz ósea de anfibios. En esta investigación, se logró comprobar su reclutamiento en el hueso frontoparietal de *Xla*, lo que estaría asociado a la necesidad de suplir una mayor producción de hueso que *Xtr*, de menor superficie final.

Los trabajos relacionados a la formación del desarrollo del hueso en anfibios siguen siendo escasos, y, a pesar de ser una especie modelo altamente estudiada, sigue existiendo un claro vacío de información respecto a *Xla*. Los genes revisados en detalle en esta investigación, que anteriormente han sido relacionados a funciones muy puntuales y específicas, son solo un pequeño ejemplo de esto, y nos empuja a buscar nuevas perspectivas sobre lo que ya se conoce. Sin duda, estos descubrimientos contribuyen a disminuir la brecha de conocimiento existente en estudios que analizan cómo variaciones en la expresión génica se asocia a cambios en la esquetogénesis de vertebrados, particularmente, en anfibios.

BIBLIOGRAFIA

- Ang, P. S., Matrongolo, M. J., Zietowski, M. L., Nathan, S. L., Reid, R. R., & Tischfield, M. A. (2022). Cranium growth, patterning and homeostasis. In *Development (Cambridge)* (Vol. 149, Issue 22). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.201017>
- Barrallo-Gimeno, A., Holzschuh, J., Driever, W., & Knapik, E. W. (2004). Neural crest survival and differentiation in zebrafish depends on mont blanc/tfap2a gene function. *Development*, 131(7), 1463–1477. <https://doi.org/10.1242/dev.01033>
- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2015). Bone development. In *Bone* (Vol. 80, pp. 14–18). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>
- Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sosic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D. M., Olson, E. N., Justice, M. J., & Karsenty, G. (2004). A Twist Code Determines the Onset of Osteoblast Differentiation. *Developmental Cell*, 6, 423–435.
- Bildsoe, H., Fan, X., Wilkie, E. E., Ashoti, A., Jones, V. J., Power, M., Qin, J., Wang, J., Tam, P. P. L., & Loebel, D. A. F. (2016). Transcriptional targets of TWIST1 in the cranial mesoderm regulate cell-matrix interactions and mesenchyme maintenance. *Developmental Biology*, 418(1), 189–203. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.08.016>
- Bildsoe, H., Loebel, D. A. F., Jones, V. J., Hor, A. C. C., Braithwaite, A. W., Chen, Y. T., Behringer, R. R., & Tam, P. P. L. (2013). The mesenchymal architecture of the cranial mesoderm of mouse embryos is disrupted by the loss of Twist1 function. *Developmental Biology*, 374(2), 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.004>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Bou-Gharios, G., Ann Garrett, L., Rossert, J., Niederreither, K., Eberspaecher, H., Smith, C., Black, C., & de Crombrughe, B. (1996). A Potent Far-Upstream Enhancer in the Mouse Proa2(I) Collagen Gene Regulates Expression of Reporter Genes in Transgenic Mice. *The Journal of Cell Biology*, 134(5), 1333–1344. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.5.1333>
- Bourhis, J. M., Vadon-Le Goff, S., Afrache, H., Mariano, N., Kronenberg, D., Thielens, N., Moali, C., & Hulmes, D. J. S. (2013). Procollagen C-proteinase enhancer grasps the stalk of the C-propeptide trimer to boost collagen precursor maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), 6394–6399. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300480110>
- Cannatella, D. C., & De Sá, R. O. (1993). Evolution Commons, and the Research Methods in Life Sciences Commons Recommended Citation Recommended Citation Cannatella D. C. and R. O. de Sá, 1993. *Xenopus laevis* as a model organism. In *Developmental Biology Commons* (Vol. 42, Issue 4). <https://www.jstor.org/stable/2992485>

- Canty, E. G., & Kadler, K. E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. In *Journal of Cell Science* (Vol. 118, Issue 7, pp. 1341–1353). <https://doi.org/10.1242/jcs.01731>
- Carroll, S. B. (2008). Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: A Genetic Theory of Morphological Evolution. In *Cell* (Vol. 134, Issue 1, pp. 25–36). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.030>
- Cervantes-Diaz, F., Contreras, P., & Marcellini, S. (2017). Evolutionary origin of endochondral ossification: the transdifferentiation hypothesis. In *Development Genes and Evolution* (Vol. 227, Issue 2, pp. 121–127). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0567-y>
- Chen, Z.-F., & Behringer, R. R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Development*, 9, 686–699.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*, 30(4), 293–316. https://doi.org/10.1258/002367796780739871/ASSET/002367796780739871.FP.PNG_V03
- Cuellar, A., Bala, K., Di Pietro, L., Barba, M., Yagnik, G., Liu, J. L., Stevens, C., Hur, D. J., Ingersoll, R. G., Justice, C. M., Drissi, H., Kim, J., Lattanzi, W., & Boyadjiev, S. A. (2020). Gain-of-function variants and overexpression of RUNX2 in patients with nonsyndromic midline craniosynostosis. *Bone*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115395>
- Currey, J. D. (2003). The many adaptations of bone. *Journal of Biomechanics*, 36(10), 1487–1495. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00124-6)
- Dallas, S. L., & Bonewald, L. F. (2010). Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, 437–443. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x>
- Elamaa, H., Peterson, J., Pihlajaniemi, T., & Destrée, O. (2002). Cloning of three variants of type XVIII collagen and their expression patterns during *Xenopus laevis* development. *Mechanism,s of Development*, 114, 109–113. www.elsevier.com/locate/mode
- Enault, S., Muñoz, D. N., Silva, W. T. A. F., Borday-Birraux, V., Bonade, M., Oulion, S., Ventéo, S., Marcellini, S., & Debiais-Thibaud, M. (2015). Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification. *Frontiers in Genetics*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00283>
- Espinoza, J., Sanchez, M., Sanchez, A., Hanna, P., Torrejon, M., Buisine, N., Sachs, L., & Marcellini, S. (2010). Two families of *Xenopus tropicalis* skeletal genes display well-

- conserved expression patterns with mammals in spite of their highly divergent regulatory regions. *Evolution and Development*, 12(6), 541–551. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2010.00440.x>
- Exposito, J. Y., Valcourt, U., Cluzel, C., & Lethias, C. (2010). The fibrillar collagen family. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 11, Issue 2, pp. 407–426). <https://doi.org/10.3390/ijms11020407>
- Farmer, D. T., Dukov, J. E., Chen, H. J., Arata, C., Hernandez-Trejo, J., Xu, P., Teng, C. S., Maxson, R. E., & Crump, J. G. (2024). Cellular transitions during cranial suture establishment in zebrafish. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50780-5>
- Fox, H. (1984). *Amphibian morphogenesis*. 301. <https://archive.org/details/amphibianmorphog0000foxh>
- Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. In *Developmental Dynamics* (Vol. 235, Issue 1, pp. 176–190). <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>
- Fritz, A., Bertin, A., Hanna, P., Nualart, F., & Marcellini, S. (2016). A Single Chance to Contact Multiple Targets: Distinct Osteocyte Morphotypes Shed Light on the Cellular Mechanism Ensuring the Robust Formation of Osteocytic Networks. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 326(5), 280–289. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22683>
- Garnero, P. (2015). The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcified Tissue International*, 97(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9996-2>
- Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. In *Molecular Genetics and Genomics* (Vol. 289, Issue 6, pp. 1045–1060). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
- Glimcher, M. J., Hodge, A. J., & Schmitt, F. O. (1957). Macromolecular aggregation states in relation to mineralization: the collagen-hydroxyapatite system as studied in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43, 860–867. <https://doi.org/10.1073/pnas.43.10.860>
- Graham, A. M., & McCracken, K. G. (2019). Convergent evolution on the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway genes EGLN1 and EPAS1 in high-altitude ducks. *Heredity*, 122(6), 819–832. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0173-z>
- Hajjawi, M. O. R., MacRae, V. E., Huesa, C., Boyde, A., Millán, J. L., Arnett, T. R., & Orriss, I. R. (2014). Mineralisation of collagen rich soft tissues and osteocyte lacunae in Enpp1^{-/-} mice. *Bone*, 69, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.016>

- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., & Cole, G. J. (1998). Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 25404–25412. <http://www.jbc.org>
- Hall, B. K. (2005). *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology* (1st ed.).
- Hanken, J., & Hall, B. K. (1993). Mechanism of Skull Diversity and Evolution. In *The Skull* (Vol. 3, pp. 1–36).
- Hart, J. C., Ellis, N. A., Eisen, M. B., & Miller, C. T. (2018). Convergent evolution of gene expression in two high-toothed stickleback populations. *PLoS Genetics*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007443>
- Hartmann, C. (2009). Transcriptional networks controlling skeletal development. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 19, Issue 5, pp. 437–443). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.001>
- Hayashi, S., Kobayashi, T., Yano, T., Kamiyama, N., Egawa, S., Seki, R., Takizawa, K., Okabe, M., Yokoyama, H., & Tamura, K. (2015). Evidence for an amphibian sixth digit. *Zoological Letters*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s40851-015-0019-y>
- Hernandez, C. J., Majeska, R. J., & Schaffler, M. B. (2004). Osteocyte density in woven bone. *Bone*, 35(5), 1095–1099. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.07.002>
- Hilton, M. J., Tu, X., & Long, F. (2007). Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by Ihh in growth region cartilage. *Developmental Biology*, 308(1), 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.011>
- Hirao, M., Hashimoto, J., Yamasaki, N., Ando, W., Tsuboi, H., Myoui, A., & Yoshikawa, H. (2007). Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 25(5), 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00774-007-0765-9>
- Hockman, D., Cretokos, C. J., Mason, M. K., Behringer, R. R., Jacobs, D. S., Illing, N., & Hogan, B. L. M. (2008). A second wave of Sonic hedgehog expression during the development of the bat limb. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0805308105
- Howard, T. D., Paznekas, W. A., Green, E. D., Chiang, L. C., Ma, N., Isela Ortiz De Luna, R., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A. D., & Wang Jabs, E. (1997). • Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genetics*, 15, 36–41. <http://www.nature.com/naturegenetics>
- Hrdlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 8, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>

- Javaheri, B., Carriero, A., Staines, K. A., Chang, Y. M., Houston, D. A., Oldknow, K. J., Millan, J. L., Kazeruni, B. N., Salmon, P., Shefelbine, S., Farquharson, C., & Pitsillides, A. A. (2015). Phospho1 deficiency transiently modifies bone architecture yet produces consistent modification in osteocyte differentiation and vascular porosity with ageing. *Bone*, *81*, 277–291. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.035>
- Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J., & Boot-Handford, R. P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, *120*(12), 1955–1958. <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>
- Kague, E., Bessling, S. L., Lee, J., Hu, G., Passos-Bueno, M. R., & Fisher, S. (2010). Functionally conserved cis-regulatory elements of COL18A1 identified through zebrafish transgenesis. *Developmental Biology*, *337*(2), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.028>
- Katikaneni, A., & Lowe, C. B. (2025). Novelty versus innovation of gene regulatory elements in human evolution and disease. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 90). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2024.102279>
- Kawane, T., Komori, H., Liu, W., Moriishi, T., Miyazaki, T., Mori, M., Matsuo, Y., Takada, Y., Izumi, S., Jiang, Q., Nishimura, R., Kawai, Y., & Komori, T. (2014). Dlx5 and Mef2 regulate a novel Runx2 enhancer for osteoblast-specific expression. *Journal of Bone and Mineral Research*, *29*(9), 1960–1969. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2240>
- Kessler, E., & Hassoun, E. (2019). Procollagen C-proteinase enhancer 1 (PCPE-1) in liver fibrosis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1944, pp. 189–201). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9095-5_14
- Khillan, J. S., Schmidtt, A., Overbeek, P. A., De Crombrugghet, B., & Westphal, H. (1986). Developmental and tissue-specific expression directed by the $\alpha 2$ type I collagen promoter in transgenic mice (developmental regulation/type I collagen genes). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 83).
- Khoshneviszadeh, M., Henneicke, S., Pirici, D., Senthilnathan, A., Morton, L., Arndt, P., Kaushik, R., Norman, O., Jukkola, J., Dunay, I. R., Seidenbecher, C., Heikkinen, A., Schreiber, S., & Dityatev, A. (2024). Microvascular damage, neuroinflammation and extracellular matrix remodeling in Col18a1 knockout mice as a model for early cerebral small vessel disease. *Matrix Biology*, *128*, 39–64. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2024.02.007>
- Kobayashi, T., & Kronenberg, H. (2005). Minireview: Transcriptional regulation in development of bone. In *Endocrinology* (Vol. 146, Issue 3, pp. 1012–1017). <https://doi.org/10.1210/en.2004-1343>
- Komatsu, Y., Yu, P. B., Kamiya, N., Pan, H., Fukuda, T., Scott, G. J., Ray, M. K., Yamamura, K. I., & Mishina, Y. (2013). Augmentation of Smad-dependent BMP signaling in neural crest cells causes craniosynostosis in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *28*(6), 1422–1433. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1857>

- Lagoutte, P., Bettler, E., Vadon-Le Goff, S., & Moali, C. (2021). Procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1), a potential biomarker and therapeutic target for fibrosis. *Matrix Biology Plus*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.mbps.2021.100062>
- Landis, W. J., & Jacquet, R. (2013). Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcified Tissue International*, 93(4), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9725-7>
- Li, A., Zhang, Y., Wang, Z., Dong, H., Fu, N., & Han, X. (2019). The roles and signaling pathways of prolyl-4-hydroxylase 2 in the tumor microenvironment. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 303, pp. 40–49). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.019>
- Liang, M. +, Golden, S., Wu, L., & Maxson, R. (1915). The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148→His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 5, Issue 12). <http://hmg.oxfordjournals.org/>
- Lieberman, D. E., Mcbratney, B. M., & Krovitz, G. (2002). The evolution and development of cranial form in Homo sapiens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ., 99, 1134–1139. www.cc.nih.gov/cipsoftware
- Long, F. (2012). Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 27–38). <https://doi.org/10.1038/nrm3254>
- Long, F., & Ornitz, D. M. (2013). Development of the endochondral skeleton. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>
- Maeno, T., Moriishi, T., Yoshida, C. A., Komori, H., Kanatani, N., Izumi, S. ichi, Takaoka, K., & Komori, T. (2011). Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. *Bone*, 49(4), 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.023>
- Meadows, J. R. S., & Lindblad-Toh, K. (2017). Dissecting evolution and disease using comparative vertebrate genomics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 18, Issue 10, pp. 624–636). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.51>
- Meyer, A., & Schartl, M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 699–704. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067499000393?casa_token=CXtaVUGgPQAAAAA:hg53w7ECuvVIW9Sh_omZGIBATATkYZ6lWeOqUwTZJDvthMh4dgOHc-Jsfacq9FWgMY9Bsyl4OOBZ

- Mishina, Y., & Snider, T. N. (2014). Neural crest cell signaling pathways critical to cranial bone development and pathology. In *Experimental Cell Research* (Vol. 325, Issue 2, pp. 138–147). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.019>
- Miura, S., Hanaoka, K., & Togashi, S. (2008). Skeletogenesis in *Xenopus tropicalis*: Characteristic bone development in an anuran amphibian. *Bone*, 43(5), 901–909. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.07.005>
- Mundaca, M., Rojas, J., Cumilaf, L., Jara, F., Muñoz, D., Pastenes, L., Méndez, M., Tovar, L. M., Torrejón, M., Montoya-Sanhueza, G., & Marcellini, S. (2024). Skull Ossification in the Andean Toad *Rhinella spinulosa* (Bufonidae) and the Genetic Model Organism *Xenopus tropicalis* (Pipidae) Reveals Heterochrony Phenomena and Frontoparietal Suture Modifications. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23280>
- Muñoz, D., Castillo, H., Henríquez, J. P., & Marcellini, S. (2018). Bone regeneration after traumatic skull injury in *Xenopus tropicalis*. *Mechanisms of Development*, 154, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.06.007>
- Muragaki, Y., Timmonst, S., Griffithii, C. M., Oh, S. P., Fadelt, B., Quertermoust, T., & Olsen, B. R. (1995). Mouse Col18a1 is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones. In *Developmental Biology* (Vol. 92). <https://www.pnas.org>
- Nagy, N., Barad, C., Hotta, R., Bhave, S., Arciero, E., Dora, D., & Goldstein, A. M. (2018). Collagen 18 and agrin are secreted by neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during enteric nervous system development. *Development (Cambridge)*, 145(9). <https://doi.org/10.1242/dev.160317>
- Narbonne, P., Simpson, D. E., & Gurdon, J. B. (2011). Deficient induction response in a *Xenopus* nucleocytoplasmic hybrid. *PLoS Biology*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001197>
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. - References - Scientific Research Publishing. (n.d.). Retrieved July 26, 2023, from [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1939088](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1939088)
- Olsen, B. R., Reginato, A. M., & Wang, W. (2000). BONE DEVELOPMENT. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 16).
- Piekarski, N., Gross, J. B., & Hanken, J. (2014). Evolutionary innovation and conservation in the embryonic derivation of the vertebrate skull. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6661>

- Powers, A. K., Kaplan, S. A., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Facial bone fragmentation in blind cavefish arises through two unusual ossification processes. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25107-2>
- Ramlochansingh, C., Branoner, F., Chagnaud, B. P., & Straka, H. (2014). Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101606>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rice, D. P. C., Rice, R., & Thesleff, I. (2003). Molecular mechanisms in calvarial bone and suture development, and their relation to craniosynostosis. In *European Journal of Orthodontics* (Vol. 25). <https://academic.oup.com/ejo/article/25/2/139/395800>
- Richardson, M. K. (2022). Theories, laws, and models in evo-devo. In *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* (Vol. 338, Issues 1–2, pp. 36–61). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23096>
- Roberts, F., Zhu, D., Farquharson, C., & Macrae, V. E. (2019). ENPP1 in the Regulation of Mineralization and Beyond. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 44, Issue 7, pp. 616–628). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.010>
- Roček, Z., Boistel, R., Lenoir, N., Mazurier, A., Pierce, S. E., Rage, J. C., Smirnov, S. V., Schwermann, A. H., Valentin, X., Venczel, M., Wuttke, M., & Zikmund, T. (2015). Frontoparietal Bone in Extinct Palaeobatrachidae (Anura): Its Variation and Taxonomic Value. *Anatomical Record*, 298(11), 1848–1863. <https://doi.org/10.1002/ar.23203>
- Rodríguez-Carballo, E., Ulsamer, A., Susperregui, A. R. G., Manzanares-Céspedes, C., Sánchez-García, E., Bartrons, R., Rosa, J. L., & Ventura, F. (2011). Conserved regulatory motifs in osteogenic gene promoters integrate cooperative effects of canonical Wnt and BMP pathways. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(4), 718–729. <https://doi.org/10.1002/jbmr.260>
- Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B., & Longaker, M. T. (2020). Mechanisms of bone development and repair. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 11, pp. 696–711). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>
- Sansilvestri-Morel, P., Harouki-Crochemore, N., Bertin, F., Bertheux, H., Vermeil De Conchard, G., Diguët, N., Desfosses, E., Lecomte, M., Gonzalez, A., Diez, J., Tupinon-Mathieu, I., & Delerive, P. (2021). Deficiency of Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 in Mice has No Major Impact on Cardiac Collagen and Function Under Basal Conditions. *Cardiovasc Pharmacol*, 78, 703–713. www.jcvp.org
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R., & Maas, R. (2000). Msx2

- deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature Genetics*, 24, 391–395. <http://genetics.nature.com>
- Sears, K. E., Behringer, R. R., Rasweiler IV, J. J., & Niswander, L. A. (2006). Development of bat flight: Morphologic and molecular evolution of bat wing digits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 6581–6586. www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0509716103
- Seppinen, L., & Pihlajaniemi, T. (2011). The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. In *Matrix Biology* (Vol. 30, Issue 2, pp. 83–92). <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.11.001>
- Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., Van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J. B., Simakov, O., Putnam, N., ... Rokhsar, D. S. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature19840>
- Shapiro, F., & Wu, J. Y. (2019). Woven bone overview: Structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups. *European Cells and Materials*, 38, 137–167. <https://doi.org/10.22203/eCM.v038a11>
- Shimeld, S. M., & Holland, P. W. H. (2000). Vertebrate innovations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ., 97, 4449–4452. www.pnas.org
- Stegen, S., Stockmans, I., Moermans, K., Thienpont, B., Maxwell, P. H., Carmeliet, P., & Carmeliet, G. (2018). Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04679-7>
- Stock, S. R. (2015). The Mineral–Collagen Interface in Bone. *Calcified Tissue International*, 97(3), 262–280. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9984-6>
- Timberlake, A. T., Jin, S. C., Nelson-Williams, C., Wu, R., Furey, C. G., Islam, B., Haider, S., Loring, E., Steinbacher, D. M., Larysz, D., Staffenberg, D. A., Flores, R. L., Rodriguez, E. D., Boggon, T. J., Persing, J. A., Lifton, R. P., & Galm, A. (2019). Mutations in TFAP2B and previously unimplicated genes of the BMP, Wnt, and Hedgehog pathways in syndromic craniosynostosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(30), 15116–15121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902041116>
- To, K., Fei, L., Pett, J. P., Roberts, K., Blain, R., Polański, K., Li, T., Yayon, N., He, P., Xu, C., Cranley, J., Moy, M., Li, R., Kanemaru, K., Huang, N., Megas, S., Richardson, L., Kapuge, R., Perera, S., ... Teichmann, S. A. (2024). A multi-omic atlas of human embryonic skeletal development. *Nature*, 635(8039), 657–667. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08189-z>

- Topczewska, J. M., Shoela, R. A., Tomaszewski, J. P., Mirmira, R. B., & Gosain, A. K. (2016). The morphogenesis of cranial sutures in zebrafish. *PLoS ONE*, *11*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165775>
- Tsang, K. Y., Chan, D., & Cheah, K. S. E. (2015). Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: Death or lineage extension? *Development Growth and Differentiation*, *57*(2), 179–192. <https://doi.org/10.1111/dgd.12203>
- Vadon-Le Goff, S., Kronenberg, D., Bourhis, J. M., Bijakowski, C., Raynal, N., Ruggiero, F., Farndale, R. W., Stöcker, W., Hulmes, D. J. S., & Moali, C. (2011). Procollagen C-proteinase enhancer stimulates procollagen processing by binding to the C-propeptide region only. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(45), 38932–38938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274944>
- Wada, H. (2010). Origin and genetic evolution of the vertebrate skeleton. *Zoological Science*, *27*(2), 119–123. <https://doi.org/10.2108/zsj.27.119>
- Yanai, I., Peshkin, L., Jorgensen, P., & Kirschner, M. W. (2011). Mapping Gene Expression in Two *Xenopus* Species: Evolutionary Constraints and Developmental Flexibility. *Developmental Cell*, *20*(4), 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.015>
- Zahm, A. M., Bucaro, M. A., Srinivas, V., Shapiro, I. M., & Adams, C. S. (2008). Oxygen tension regulates preosteocyte maturation and mineralization. *Bone*, *43*(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.03.010>
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., & De Crombrughe, B. (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental Dynamics*, *209*(4), 377–386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199708\)209:4<377::AID-AJA5>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199708)209:4<377::AID-AJA5>3.0.CO;2-F)
- Zhou, G., Lefebvre, V., Zhang, Z., Eberspaecher, H., & De Crombrughe, B. (1998). Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(24), 14989–14997. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14989>
- Zuo, G. L., Zhang, L. F., Qi, J., Kang, H., Jia, P., Chen, H., Shen, X., Guo, L., Zhou, H. B., Wang, J. S., Zhou, Q., Qian, N. D., & Deng, L. F. (2015). Activation of HIF α pathway in mature osteoblasts disrupts the integrity of the osteocyte/canalicular network. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121266>

