



**Universidad de Guanajuato**  
**División de Ciencias Naturales y Exactas**

**CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES  
PLACENTARIAS: SU CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN Y  
MORFOGÉNESIS PARA LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS  
ESQUELÉTICAS COMPLEJAS**

Tesis que presenta  
**ESTEFANIA GARAY PACHECO**  
Para obtener el grado de  
Licenciada en Biología Experimental

Directora de tesis:  
Dra. Jessica Cristina Marín Llera  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Co-directora de tesis:  
M. en C. Juana López Godínez  
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Comité Tutorial:  
Dra. Patricia Ponce-Noyola  
Dr. Jesús Chimal-Monroy  
Dr. Gustavo Alexis Niño-Vega  
Dra. Ruth Reyes-Cortés

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 1887-Fronteras de la Ciencia), y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT, proyectos IN213314 y IN211117)

Todo el trabajo experimental de este proyecto se desarrolló en el laboratorio de morfogénesis y regeneración a cargo del Dr. Jesús Chimal Monroy, ubicado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco la beca que recibí con número de registro: 29954 que fue otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; proyecto 1887-Fronteras de la Ciencia) para realizar mi tesis de licenciatura en este proyecto.

## *Dedicatorias*

A mis padres, Alicia y Jorge, gracias por todo su amor, apoyo y complicidad en todos mis ideales y metas. Cada uno de mis éxitos a lo largo de mi vida, también es suyo, nunca tendré vida suficiente para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Los amo mucho.

A mis hermanos, Jacqueline, Gael y Ulises, a pesar de las diferencias y peleas cada momento en familia es atesorado en mi corazón. Gracias por los buenos y malos momentos haciendo más amenos los momentos más difíciles.

A mi tía, Aurora y a su esposo Javier, por ser como unos segundos padres y por tratarme y cuidarme como una segunda hija. Gracias por todo su apoyo durante el reto que conllevo para mi realizar mi tesis en una ciudad totalmente diferente y que me saco de mi zona de confort, todo el proceso fue más sencillo gracias a ustedes. Los quiero mucho.

A mi pequeña prima Catalina, quien fue y es una fuente de risas, ocurrencias y buenos momentos desde que llegue a la CDMX, gracias por sacarme una carcajada cuando más se necesita.

A mis abuelos Aurora, Altagracia y José, quienes siempre han demostrado su cariño, amor desde que tengo uso de memoria. Gracias por todo.

A mis mejores amigas, Fernanda, Zazil y Alejandra, quienes fueron un apoyo enorme durante toda la carrera en Guanajuato. Gracias por enseñarme lo que es una amistad incondicional, por ser un pilar que nunca me dejo caer, por cada una de las risas, lágrimas y momentos inolvidables que llevo siempre atesorado. No saben la falta que me hacen a veces acá en CDMX. Las amo con todo mi corazón.

A mis mejores amigos, Juan Carlos y Edwin, siempre lograron ver algo en mí que yo no podía ver. Son el mejor ejemplo de que las amistades perduran por años y años y, aunque no siempre estemos en contacto, la amistad y el cariño nunca va a cambiar. Los quiero mucho.

A mis amigos Monse, Aldair, Tetuán, Mayra, Ammed, Camila, Ale, Itzel y Raúl, gracias por tantos buenos momentos, fiestas, risas y horas de estudio, cada momento en Guanajuato fue invaluable gracias a usted.

A mis amigos del laboratorio de morfogénesis y regeneración Damián, Alexa, Francisco, Dennet y Mario, gracias por hacer más ameno el tiempo en el laboratorio, por cada ocurrencia y cada risa. Sobre todo, gracias por siempre generar nuevo conocimiento, retroalimentación y entendimiento de la biología del desarrollo. Los quiero mucho.

A la Dra. Jessica Marín y al Dr. Jesús Chimal por ir junto conmigo en la realización de este proyecto y hacerlo posible, por enseñarme todo un nuevo mundo en la biología del desarrollo. Gracias por toda la paciencia y por todo el conocimiento generado.

*“Observas la ciencia como si fuera una invención desalentadora del hombre, algo alejado de la vida real y que debe ser vigilada con cautela y separada de la vida cotidiana. Pero la ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben separarse. La ciencia me proporciona una explicación parcial de la vida. Hasta donde puedo observar está basada en los hechos, la experiencia y el experimento.”*

*Rosalind Franklin*

## **Agradecimientos académicos**

A la Dra. Jessica Cristina Marín Llera. Toda la planeación y planteamiento de este proyecto estuvo bajo su dirección y coordinación. Por su asesoramiento en la revisión constante de mi escrito de tesis y por la enseñanza de las técnicas empleadas en este trabajo. Su contribución intelectual a lo largo de este proyecto y en el abordaje de los experimentos que se realizaron en este trabajo fueron fundamentales para avanzar en la obtención de los resultados.

A mi co-directora de tesis la M. en C. Juana López Godínez por su retroalimentación al escrito final de tesis y, sobre todo, su apoyo y guía durante toda la carrera.

Al Dr. Juan José Montesinos y al M. en C. Víctor Adrián Cortés Morales, ambos del laboratorio de Células Troncales Mesenquimales a cargo de Dr. Juan José Montesinos Montesinos en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Siglo XXI, por proveernos las células mesenquimales estromales de placenta que se utilizaron en los experimentos de este trabajo.

A mis sinodales la Dra. Patricia Ponce, el Dr. Jesús Chimal, el Dr. Gustavo Niño y la Dra. Ruth Reyes por su retroalimentación y comentarios al trabajo, esto conllevó a una mejor redacción y entendimiento a la información presentada en el proyecto.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo jefa de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su ayuda en la recopilación de artículos de investigación que se utilizaron como referencias en los antecedentes de este proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Abreviaturas</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Índice de figuras</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Resumen</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Marco teórico</b> .....	<b>12</b>
4.1. La diferenciación celular como proceso de especialización .....	12
4.2. Células mesenquimales estromales .....	18
4.2.1. Capacidad de diferenciación de las MSC .....	19
4.2.2. Células mesenquimales estromales placentarias.....	20
4.3. Desarrollo embrionario de las extremidades.....	24
4.3.1. Especificación del campo de la extremidad.....	24
4.3.2. Inducción del primordio .....	26
4.3.3. Establecimiento de los ejes en la extremidad embrionaria.....	27
4.3.4. Diferenciación y crecimiento de la extremidad .....	30
4.3.5. Morfogénesis de la extremidad .....	37
4.4. Extremidades recombinantes .....	40
4.4.1. Aportaciones de las extremidades recombinantes al entendimiento del desarrollo de la extremidad .....	41
4.4.2. Estudio del potencial de diferenciación y morfogenético de las MSC de placenta utilizando la técnica de ER.....	43
<b>5. Justificación</b> .....	<b>45</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>45</b>
<b>7. Objetivo general</b> .....	<b>46</b>
<b>8. Objetivos particulares</b> .....	<b>46</b>
<b>Diseño experimental</b> .....	<b>47</b>
<b>9. Materiales y métodos</b> .....	<b>48</b>
9.1. Extremidades recombinantes .....	48
9.1.1. Obtención de ectodermos .....	48
9.1.2. Obtención de células para rellenar ectodermos .....	49
9.1.3. Rellenar ectodermos .....	49
9.1.4. Implantación de ectodermos .....	49
9.2. Tinción con azul alciano .....	50
9.3. Inclusión en parafina y cortes histológicos .....	51

9.4. Tinción con Hematoxilina y Eosina .....	51
9.5. Microscopía electrónica de barrido .....	52
9.6. Hibridación <i>in situ</i> para <i>Fgf-8</i> .....	53
9.7. Tinción de muerte celular con LysoTracker .....	54
9.8. Obtención de RNA, retrotranscripción y PCR cuantitativa (qRT-PCR) .....	55
9.9. Inmunofluorescencia de SOX9, SCX y HLA .....	56
<b>10. Resultados</b> .....	<b>57</b>
10.1. Evaluación del compromiso de las MSC placentarias hacia linajes mesodérmicos presentes en la extremidad embrionaria .....	58
10.2. Determinación del patrón de expresión de SOX9 y SCX en las extremidades recombinantes de placenta .....	59
10.3. Evaluación del fenotipo asociado a condrogénesis de las extremidades recombinantes y la organización celular.....	61
10.4. Evaluación del mantenimiento de la AER y las señales inductivas que emite .....	65
10.5. Evaluación de la expresión de <i>fgf-8</i> en el ectodermo de las extremidades recombinantes.....	66
10.6. La muerte celular es un proceso dependiente de la expresión de <i>Fgf-8</i> .....	67
<b>11. Discusión</b> .....	<b>68</b>
<b>12. Conclusiones y perspectivas</b> .....	<b>71</b>
<b>13. Apéndices</b> .....	<b>71</b>
13.1. Anexo: Soluciones para realizar las extremidades recombinantes .....	72
13.2. Anexo: Soluciones para tinción azul alciano .....	72
13.3. Anexo: Soluciones para microscopía electrónica de barrido .....	72
13.4. Anexo: Soluciones para hibridación <i>in situ</i> .....	73
13.5. Anexo: Soluciones para LysoTracker.....	75
13.6. Anexo: Secuencias de primers para qRT-PCR.....	75
13.7. Anexo: Soluciones para inmunofluorescencia y anticuerpos para SOX9, SCX y HLA.....	76
<b>14. Referencias bibliográficas</b> .....	<b>77</b>

## **1. Abreviaturas**

**AER** - Apical Ectodermal Ridge

**AP** - Antero-Posterior

**ANZ** - Anterior Necrotic Zone

**bHLH** - basic Helix-Loop-Helix

**BMP** - Bone Morphogenetic Protein

**Col2a1** - Collagen type II

**DMEM** - Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

**DV** - Dorso-Ventral

**ER** - Recombinant Limb

**En1** - Engrailed-1

**ECM** - Extracellular Matrix

**FACIT** - Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices

**FGF** - Fibroblast Growth Factor

**GDF5** - Growth Differentiation Factor 5

**HLA** - Human Leukocyte Antigen

**Irx** - Iroquois-class homeodomain protein

**Lmx1** - LIM homeobox genes

**LPM** - Lateral Plate of Mesoderm

**TCA** - Trichloroacetic Acid

**TGF- $\beta$**  - Transforming Growth Factor Beta

**TBX** - T-box genes

**MHC** - Major Histocompatibility Complex

**Mkx** - Mohawk

**MSC** - Mesenchymal Stromal Cells

**N-CAM** - Neural Cell Adhesion Molecule

**OP** - Opaque Patch

**PBS** - Phosphate Buffered Saline



**PCR1** - Complejo Represivo Polycomb  
**PD** - Proximo-Distal  
**PNZ** - Posterior Necrotic Zone  
**RA** - Retinoic Acid  
**Sall** - Sal-like  
**SEM** - Scanning Electron Microscopy  
**Scx** - Scleraxis  
**FBS** - Fetal Bovine Serum  
**SHH** - Sonic Hedgehog  
**SLRP** - Small Leucine-Rich Proteoglycans  
**VEGF** - Vascular Endothelium Growth Factor  
**Wnt** - Wingless e Int  
**ZI** - Undifferentiated Zone  
**ZPA** - Zone Polarizing Activity

## 2. Índice de figuras

<b>Figura 1. Representación esquemática de los potenciales de diferenciación dentro de las capas germinales .....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2. Representación esquemática de los tipos de división celular, proceso de diferenciación celular y morfogénesis para la correcta formación de los órganos .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 3. Representación esquemática de la placenta.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4. Potencial de diferenciación de las MSC placentarias .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5. Principales centros organizadores en el primordio de la extremidad.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 6. Especificación del campo de la extremidad .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 7. Inducción del primordio de la extremidad .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 8. Señalizaciones AER-FGF induce genes que establecen el patrón del eje DV y el crecimiento coordinado de los ejes PD y AP .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 9. Representación esquemática del proceso de condrogénesis y osificación endocondral.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Mantenimiento y reclutamiento de progenitores de tendón por factores TGF-<math>\beta</math> .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 11. Principales etapas de la miogénesis en la extremidad .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 12. Muerte celular mesodérmica y ectodérmica en la extremidad embrionaria....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 13. Extremidades recombinantes como modelo de estudio .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14. Análisis de qRT-PCR de la expresión de genes tempranos de diferenciación hacia los linajes condrogénico, tenogénico y osteogénico en el sistema de ER-PL .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 15. Inmunofluorescencia de HLA en ER-Placenta .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 16. Inmunofluorescencia de Sox9 en ER-Placenta .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 17. Inmunofluorescencia de SCX en ER-Placenta .....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 18. Fenotipo en azul alciano de ER-Placenta a las 24 horas post-operación .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 19. Fenotipo en azul alciano de ER-Placenta a periodos de tiempo largos (48, 72 horas y 6 días post-operación) .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 20. Organización celular de la ER-Placenta a las 24 horas post-operación.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 21. Organización celular de la ER-Placenta a las 48 y 72 horas post-operación....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de ER-Placenta a las 24 horas post-operación .....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 23. Hibridación <i>in situ</i> para <i>Fgf-8</i> en las ER-Placenta .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 24. Presencia de muerte celular en las ER-Placenta con LysoTracker .....</b>	<b>67</b>

### 3. Resumen

Las células mesenquimales estromales (MSC) son consideradas un grupo de células indiferenciadas, multipotentes y altamente proliferativas. Con el paso de los años las MSC han sido identificadas en diversos tejidos adultos y perinatales, entre ellos, la placenta. Uno de los propósitos por los cuales estas células son estudiadas, es su posible aplicación en la medicina regenerativa y terapia celular. Sin embargo, es necesario conocer más sobre su naturaleza biológica para que su posible aplicación sea segura para los pacientes. Antes de pensar en cualquier uso clínico, es importante conocer cómo estas células interpretan señales inductivas que las lleven a comprometerse a distintos linajes celulares, y, sobre todo si estas células además de diferenciarse son capaces de crear un patrón morfogenético que las lleve a formar una estructura compleja. Para este fin se requiere evaluar su comportamiento local en el tiempo y espacio bajo señales inductivas, idealmente en un sistema *in vivo*. En este proyecto se utilizó la técnica de “extremidades recombinantes” como un sistema que permite el estudio de la capacidad morfogenética y de diferenciación de las MSC humanas provenientes de placenta. Esta aproximación experimental consiste en ensamblar células mesodermales en el ectodermo vacío de un primordio de extremidad de pollo (*Gallus gallus*) en desarrollo para posteriormente ser implantado en un embrión de hospedero de la misma especie. En este trabajo, se ensamblaron MSC de placenta como células mesodermales en los ectodermos de pollo, simulando un primordio de extremidad. Esto es posible, ya que el desarrollo de las extremidades es un proceso conservado entre las especies de vertebrados. De esta forma, en este sistema las MSC reciben las mismas señales inductivas que recibe una extremidad embrionaria durante su desarrollo.

En este trabajo se demostró que las MSC placentarias sobreviven en el sistema *in vivo* de extremidades recombinantes y se comprometen hacia los distintos linajes dentro de la extremidad expresando genes maestros para iniciar el proceso de diferenciación, preferencialmente hacia el linaje condrogénico. Además, se organizan de manera similar a lo que se observa durante el desarrollo embrionario de las extremidades. Esto permitió determinar que las MSC placentarias de humano interpretan señales embrionarias, que se comprometen a destinos celulares presentes en la extremidad y que se organizan espacialmente. Asimismo, se demostró que la técnica de extremidades recombinantes es una herramienta poderosa para evaluar el potencial de diferenciación y de morfogénesis de las MSC, y posiblemente de otros tipos de células progenitoras o células troncales adultas.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 La diferenciación celular como proceso de especialización**

La diferenciación celular es el proceso por el cual una célula o grupo de células cambian de un estado indiferenciado hacia uno especializado. Este proceso genera cambios en la expresión génica que las llevan a adoptar una morfología y función particular como consecuencia de la interpretación de las señales que reciben (Gilbert, 2016).

La diferenciación celular es el resultado de la integración de diferentes estímulos de manera espacio-temporal; es un proceso sensible a los estímulos mecánicos y químicos del entorno (Ng et al., 2018). Todos los organismos multicelulares derivan de una célula totipotente y, a medida que la célula se divide, las células subsecuentes adquieren un destino hacia algún tipo celular generando un modelo jerárquico que va restringiendo su potencial de diferenciación (Iwanami & Iwami, 2018).

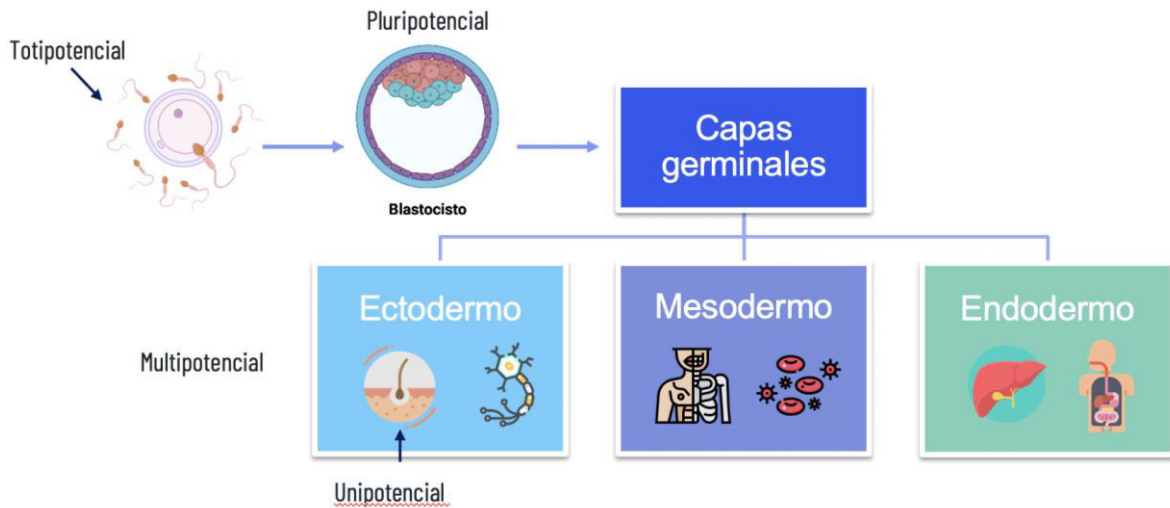
Una célula indiferenciada no presenta un fenotipo característico de algún tejido, su función principal es ser un reservorio para mantener su homeostasis y, además, pudieran participar en la regeneración de los mismos. Por otro lado, una célula diferenciada es aquella que adquirió por medio de señales inductoras un fenotipo característico de algún tejido, expresando genes que le confieren una función determinada.

El proceso de diferenciación celular inicia desde la fertilización, cuando la célula totipotente, el cigoto, comienza a dividirse, y el potencial de diferenciación se restringe en la progenie. El potencial de diferenciación se refiere a la cantidad de tipos celulares que se pueden generar a partir de una misma célula indiferenciada. Algunas células son capaces de generar linajes de las tres capas embrionarias, otras, tienen un potencial más restringido. De manera que, con base en su potencial de diferenciación, las células se pueden clasificar en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes.

El cigoto es considerado la única célula totipotencial con la capacidad de dar lugar a todos los linajes de las tres capas germinales y a los tejidos extraembrionarios en un organismo. Por otro lado, la blástula es considerada un conjunto de células pluripotentes que dan lugar a los linajes celulares dentro de las tres capas germinales en la gastrulación (Thomson et al., 2011).

Durante las primeras divisiones del desarrollo embrionario de algunos organismos, las células permanecen indiferenciadas. Una vez iniciado el proceso de gastrulación se originan

las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Por ejemplo, a partir de la capa ectodérmica se desarrollará el sistema nervioso y la piel, de la mesodérmica se originará el sistema esquelético, los tejidos conjuntivos y el sistema hematopoyético, mientras que a partir del endodermo se formará todo el sistema digestivo (Fig.1) (Wolpert, 2002).



**Figura 1. Representación esquemática de los potenciales de diferenciación dentro de las capas germinales.** El cigoto es la única célula totipotencial. Una célula pluripotencial se diferencia en todos los tipos celulares dentro de las tres capas. Una multipotencial se diferencia en los linajes de una de las capas. Las unipotenciales solo se diferencian hacia un linaje celular (ejemplificado con la flecha azul a uno de los linajes ectodérmicos).

La formación de las capas germinales conlleva el *compromiso* de las células y, por ende, el generar células cada vez más especializadas hacia los distintos linajes propios de cada capa. El compromiso de las células se induce mediante señales emitidas por centros organizadores, los cuales son fuentes de señales inductoras encargadas de dirigir el destino de las células. El compromiso celular puede entenderse en dos etapas consecutivas: 1) si una célula o grupo de células comprometidas hacia un linaje, al recibir otras señales que modifican su destino significa que este grupo de células están *especificadas*; 2) por otro lado, se dice que una célula o grupo de células están *determinadas* hacia un destino celular, cuando las señales recibidas ya no pueden cambiar el destino de las células al cual están comprometidas, independientemente de que dejen de recibir las señales inductoras o sean reemplazadas por otro tipo de señalización (Zeller et al., 2009).

En momentos específicos del desarrollo embrionario, grupos de células se vuelven competentes a distintas señales inductoras. Existen dos tipos de inducción: la *inducción instructiva*, en la que una señal inductora es necesaria para iniciar la expresión de un gen en la célula inducida para que esta se diferencie; y la *inducción permisiva*, en la que la célula contiene todas las señales necesarias para activar los genes que deben ser expresados, pero es necesario un ambiente que permita la expresión de estas características y comiencen la diferenciación.

La inducción celular se genera por la interacción célula-célula o célula-matriz, y en otros casos, si un grupo de células tiene que inducir a otro, pero se encuentran a cierta distancia, el primer grupo de células es capaz de inducirlas mediante moléculas que se difunden a través del espacio extracelular (Saxen et al., 1976). A estas moléculas inductoras se les conoce como factores paracrinos o factores de crecimiento, los cuales pueden actuar en forma de gradientes de *morfógenos* que, a lo largo de los ejes corporales se presentan en diferentes concentraciones y son capaces de regular y activar genes que controlan el desarrollo del organismo. Estos factores se unen a un receptor extracelular induciendo un cambio conformacional en su dominio citoplasmático llevándolo a adquirir una propiedad enzimática que cataliza una serie de reacciones que amplifican la señal. Esta señalización puede activar o inhibir diversos factores de transcripción generando un impacto en la expresión génica de la célula. La mayoría de los factores paracrinos son agrupados en cuatro familias principales: la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), la familia Hedgehog, la familia Wnt (Wingless Int), y la superfamilia TGF- $\beta$  (Wolpert, 2002).

El proceso de diferenciación celular requiere de la división celular. Existen dos mecanismos por los cuales la célula se divide. La *división asimétrica*, en la cual la célula origina dos células hijas, en donde una de ellas se mantendrá en estado indiferenciado mientras que la otra genera una célula progenitora capaz de diferenciarse (Fig. 2). En la *división simétrica*, ambas células hijas seguirán en estado indiferenciado o bien, entran al programa de diferenciación (Wang et al., 2014) (Fig. 2). Las decisiones celulares entre un tipo de división y otro se da según las necesidades del tejido y las señales que reciban. La división asimétrica mantiene la homeostasis normal del tejido, no obstante, si la reserva de células indiferenciadas está agotándose se puede optar por la división simétrica para mantener el número de células indiferenciadas o bien, cuando el tejido sufre algún daño y se requiere una

mayor cantidad de células indiferenciadas para que posteriormente se diferencien (Morrison & Kimble, 2006; Shahriyari & Komarova, 2013).

Las *células troncales* son un grupo de células indiferenciadas que pueden diferenciarse en varios tipos celulares (Atala & Lanza, 2013). Son capaces de dividirse de manera simétrica y asimétrica, logrando mantener la homeostasis o bien, ayudar a recuperar el tejido en caso de algún daño. Las células troncales tienen dos características fundamentales: 1) la capacidad de mantenerse en un estado indiferenciado sin perder su capacidad de diferenciación y, 2) la capacidad de autorrenovarse, es decir, reproducirse conservando sus características para mantener una población troncal durante periodos largos de tiempo.

Las células troncales se identificaron en el sistema hematopoyético (*Hematopoietic Stem Cells*), gracias a McCulloch y Till, quienes realizaron inyecciones subsecuentes de células de médula ósea en ratones irradiados, en los que identificaron que cada nódulo formado en el bazo representaba una colonia que derivaba en una CFU (Unidad Formadora de Colonias), después se evaluó que esta población de células tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares del sistema hematopoyético (Till & McCulloch, 1961).

Las células troncales se han identificado también en otras fuentes. Un ejemplo, son las células troncales embrionarias (*Embryonic Stem Cells*) aisladas a partir de la masa celular interna de embriones de mamíferos. Células derivadas de esta zona demostraron tener características de células troncales en cultivos *in vitro* (Thomson et al., 1998).

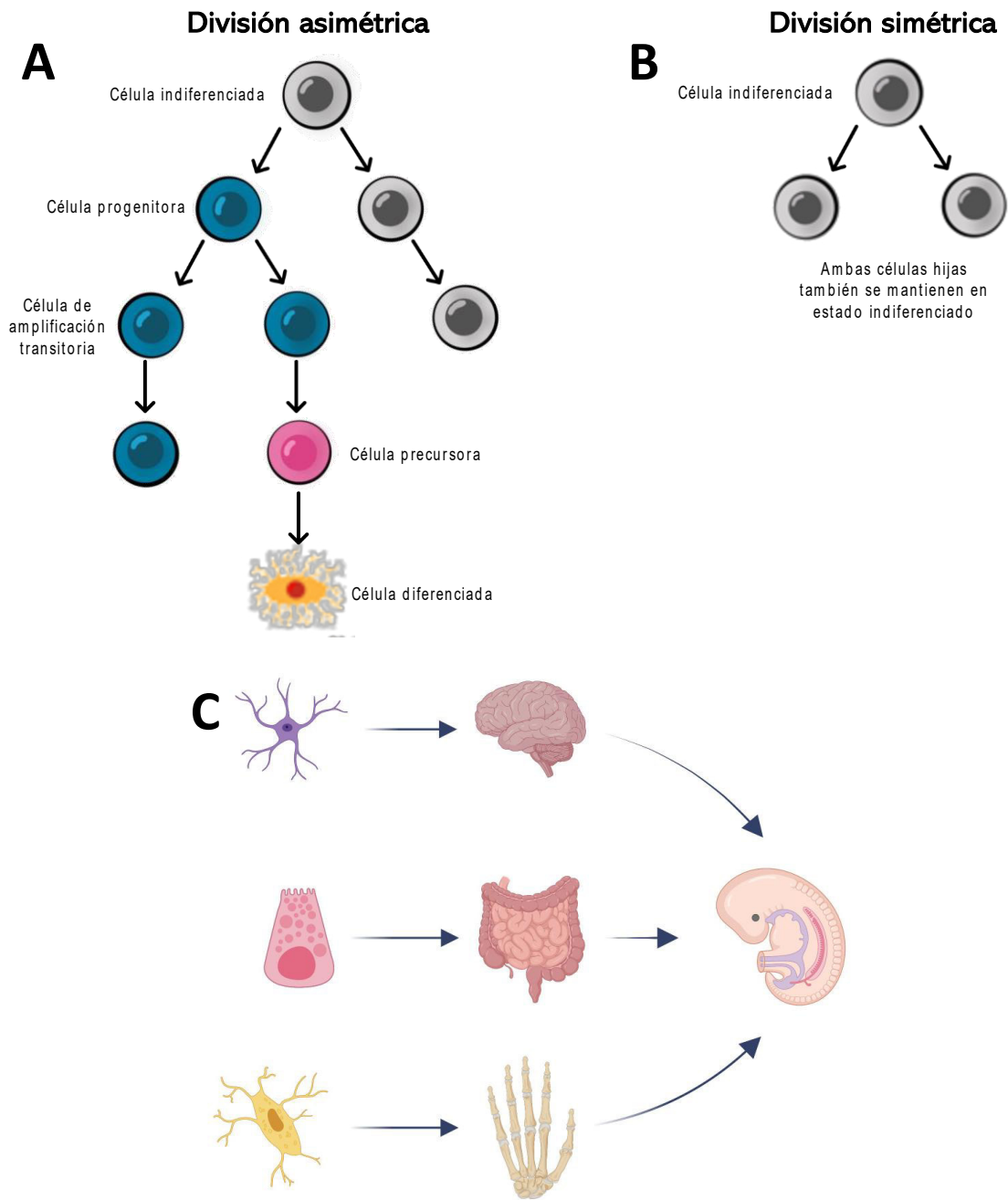
De regiones del sistema nervioso central en desarrollo o adulto se han aislado células troncales neurales (Kuhn and Svendsen, 1999) describiéndose su capacidad multipotente para diferenciarse hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Mujtaba et al., 1999). La capacidad de autorrenovación de estas células comprobó *in vivo* e *in vitro* y, se llegó a la conclusión de que es necesario la activación e integración de diferentes vías de señalización como SHH, BMP, Notch y FGF2 para activar los factores de transcripción que regulan los procesos de autorrenovación y diferenciación (Li et al., 2012; Shimogori et al., 2004).

El ciclo celular en las células troncales está altamente regulado. Las células troncales permanecen en la etapa G0 del ciclo celular, lo que les permite entrar en un estado no proliferativo o de quiescencia, evitando así, el desabasto del reservorio (White & Dalton, 2005).

Una vez que las células troncales se dividen de manera asimétrica y una de sus células hijas abandona el estado de troncalidad recibe el nombre de *célula progenitora*. Si la célula progenitora se divide para aumentar el número poblacional en los tejidos y después de un número de divisiones *limitado* manteniendo sus características, son llamadas *células de amplificación transitoria*. Posteriormente, las células se comprometen y se convierten en *células precursoras* de un linaje celular específico (Fig. 2) (Marín-Llera et al., 2019).

De manera coordinada con el proceso de diferenciación, se lleva a cabo la morfogénesis, un proceso dependiente de las señales inductoras en el que, las células son dirigidas a tomar una posición específica dentro de un patrón tridimensional organizado en espacio-tiempo para desarrollar estructuras complejas como son los tejidos y finalmente, un órgano funcional (Fig. 2). La morfogénesis es el resultado de la coordinación de procesos como la proliferación, apoptosis, migración, secreción de moléculas de adhesión y diferenciación celular. En este sentido, algunos factores que controlan todos estos procesos son la presencia o ausencia de factores de transcripción que activan o inhiben la transcripción de genes, las modificaciones epigenéticas, las cuales podrían estar modulando la expresión de genes de cada linaje celular, son mecanismos que deben ser activados en conjunto para poder coordinar el completo desarrollo de un organismo (Fig. 2).





**Figura 2. Representación esquemática de los tipos de división celular y del proceso de diferenciación celular y morfogénesis para la correcta formación de los órganos.** **A.** La división asimétrica genera dos células en la cual una de ellas abandona la troncalidad. **B.** La división simétrica genera dos células iguales, ambas pueden mantenerse en estado indiferenciado o entrar al proceso de diferenciación. Se muestran los tipos celulares que se generan durante la división celular. **C.** Representación esquemática de la importancia de la organización celular, es necesario que la diferenciación y la morfogénesis sean concomitantes para el correcto desarrollo de los órganos dentro de un organismo.

## 4.2 Células mesenquimales estromales

En el estudio de los procesos de diferenciación dentro de un organismo se han descrito distintas poblaciones celulares, todas ellas con potenciales de diferenciación característico. Las células mesenquimales estromales (MSC por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stromal Cells*) se caracterizaron inicialmente como un grupo de células indiferenciadas multipotentes obtenidas de tejidos mesodérmicos adultos.

El estudio de estas células comenzó con el grupo de trabajo de Friedenstein en 1968, utilizando ratones para describir una población de células adherentes aislada de medula ósea que creaban un microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein et al., 1968). Más adelante, se caracterizaron sus capacidades de originar estroma medular, hueso y cartílago basándose en trasplantes de células de MO en ratones singénicos (Friedenstein et al., 1978). Después, Owen y colaboradores demostraron que estas células tenían la capacidad de diferenciarse a los linajes osteogénico y condrogénico, reportando una alta capacidad de proliferación y diferenciación de las células en cámaras de difusión. Al ser cultivadas *in vitro* en una suspensión de células provenientes de la medula ósea, se identificaron colonias que derivaban de un solo progenitor y que presentaban una morfología fibroblastoide (Owen & Friedenstein, 1988).

Más adelante se les denominó “*Mesenchymal Stem Cells*”, sugiriéndolas como un tipo de células troncales involucradas en la formación de cartílago y hueso en la vida de un organismo y en la reparación tisular (Caplan, 1991). Sin embargo, por la falta de evidencia que comprobara que este grupo celular fuera troncal, se cambió el acrónimo de MSC con relación a “Stromal Cells” (Horwitz et al., 2005). Posteriormente, se logró el aislamiento y expansión de células de medula ósea y periostio humano y se comprobó su potencial de diferenciación hacia linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico bajo condiciones *in vitro*, con lo que surgió el interés del posible uso de estas células en la medicina regenerativa (Haynesworth et al., 1992; Nakahara et al., 1991; Pittenger et al., 1999).

A partir de estos trabajos pioneros en su identificación, poblaciones celulares con características de MSC se han aislado de diferentes fuentes adultas y embrionarias (Revisado en Crisan et al., 2008; Kwon et al., 2016).

Sin embargo, se observó que los grupos de investigación diferían en las formas de aislamiento, expansión y caracterización de las MSC, por lo que en el 2006 la Sociedad Internacional para Terapia Celular propuso una serie de criterios estándares para su identificación y aislamiento: 1) las células deben ser adherentes a plástico cuando son mantenidas en cultivo, 2) deben expresar los antígenos CD105, CD73 Y CD90, deben ser negativas para CD45, CD34, CD14, CD11B, CD79, CD19, HLA-DR, y 3) deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos. Así mismo, se les asignó el nombre “*Mesenchymal Stromal Cells*” para referirse a las células aisladas de medula ósea o de cualquier otra fuente (Dominici et al., 2006).

El interés en las MSC se ha encausado principalmente en sus posibles usos en la terapia celular y medicina regenerativa, enfocándose en la evaluación de sus capacidades inmunoreguladoras e inmunomoduladoras como la secreción de moléculas que inducen la restauración del tejido, la capacidad de retardar la muerte celular en lesiones con la finalidad de generar terapias eficientes y tratamientos para enfermedades inmunológicas o degenerativas (Revisado en da Silva Meirelles et al., 2009). Con base en estas características se sugiere que las MSC son una fuente de células para futuros tratamientos de diferentes enfermedades o lesiones tisulares. Sin embargo, aún falta profundizar sobre su comportamiento biológico *in vivo*, ya que la mayoría de los estudios se realizan *in vitro*. Es necesario conocer como estas células responden a señales de diferenciación para formar un tejido o para integrarse en un tejido específico.

#### **4.2.1 Capacidad de diferenciación de las MSC**

Las MSC se han aislado a partir de diferentes tejidos, y estas presentan diferentes capacidades de diferenciación dependiendo de la fuente de la que se obtengan.

Por ejemplo, en tejido adiposo se describió una población de MSC con la capacidad de diferenciarse a los linajes, osteogénico en el cual se observó una mineralización de la matriz, en condrogénico evidenciando la formación de nódulos de cartílago, mientras que su diferenciación al linaje miogénico se caracterizó por la expresión de los factores de transcripción *Myf6*, *Myf5*, *Myod1*, *Myogenina* (Zuk et al., 2002).

También, se han aislado MSC provenientes de sangre de cordón umbilical, una población celular que mostró un potencial para diferenciarse en osteoblastos presentando una matriz mineralizada y, hacia células de linaje adipogénico que presentaban una acumulación

perinuclear de vacuolas lipídicas. Otras poblaciones aisladas de sangre de cordón umbilical, mostraron una mayor capacidad de regeneración nerviosa en la medula espinal de conejos, y menor inflamación en comparación de otras MSC (Yang et al., 2018), sugiriendo que las MSC participan en la recuperación funcional del tejido nervioso después de generarse un daño.

Otros trabajos han reportado que en medula ósea existe una población de MSC con capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia linajes de las otras capas germinales como el mesodermo visceral, neuroectodermo y endodermo. También, cuando se inyectan en un blastocito temprano, contribuyen a la mayoría de los tipos de células somáticas aunque es poco el número total de células que logran diferenciarse (Jiang et al., 2007). Debido a que estas observaciones se establecieron bajo condiciones *in vitro*, no se puede atribuir de manera directa que tengan las mismas propiedades *in vivo*.

Algunos estudios han intentado demostrar que las MSC tienen las mismas características tanto *in vitro* como en un ambiente *in vivo*. Por ejemplo, una población de osteoprogenitores CD146+ presentes en el tejido conjuntivo que cubren los microvasos de la medula ósea, fue injertada en un estroma funcional en sitios heterotópicos y, se observó la formación de un microambiente hematopoyético, junto con el establecimiento de células subendoteliales dentro de un estructura ósea heterotópica (Sacchetti et al., 2007).

Es importante resaltar que en este tipo de ensayos *in vivo* las células son pre-inducidas, es decir, se aíslan y cultivan en medios que contienen factores que inducen su diferenciación. Posterior a esto, las células se siembran en materiales conocidos como andamios para inducir interacciones celulares que contribuyen en la formación de tejidos funcionales y finalmente, se analiza su integración a los tejidos por medio de trasplantes (Weng et al., 2016). Por lo que, es necesario determinar si de manera autónoma las células tienen la capacidad de especificarse y diferenciarse, o si su especificación debe ser condicionada.

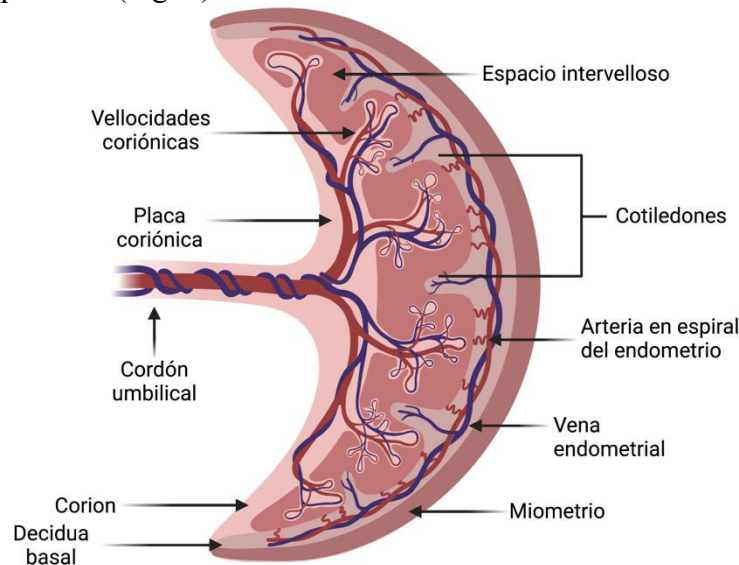
#### **4.2.2 Células mesenquimales estromales placentarias**

Además de tejidos adultos como la medula ósea y tejido adiposo, o tejidos perinatales como la sangre de cordón umbilical, las MSC han sido aisladas a partir de tejidos extraembrionarios como la placenta.

La placenta está compuesta por una porción fetal (el corión) y una porción materna (decidua basal), ambas participan en el intercambio fisiológico de sustancias entre las circulaciones

materna y fetal (Turco & Moffett, 2019). Al avanzar la edad gestacional la placenta se hace más compleja, alrededor del día 21 de desarrollo las células del citotrofoblasto proliferan, el mesodermo coriónico crece y se desarrollan los vasos sanguíneos, estas tres estructuras darán lugar a las vellosidades coriónicas (Wojciech, 2015). Las vellosidades continúan creciendo hasta llegar al endometrio y establece una comunicación con los vasos del embrión. Se genera una capa llamada placa coriónica que está en contacto con la placa basal (parte más externa de la placenta; conformada por el sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto y decidua basal) y que esta a su vez, tiene contacto con la pared uterina.

Estas múltiples capas separan la sangre fetal y la sangre materna, el intercambio de gases y metabolitos se realiza a través de estas estructuras (Wojciech, 2015). Se ha sugerido que se pueden aislar varias poblaciones de MSC a partir de los distintos componentes que conforman la placenta (Fig. 3).



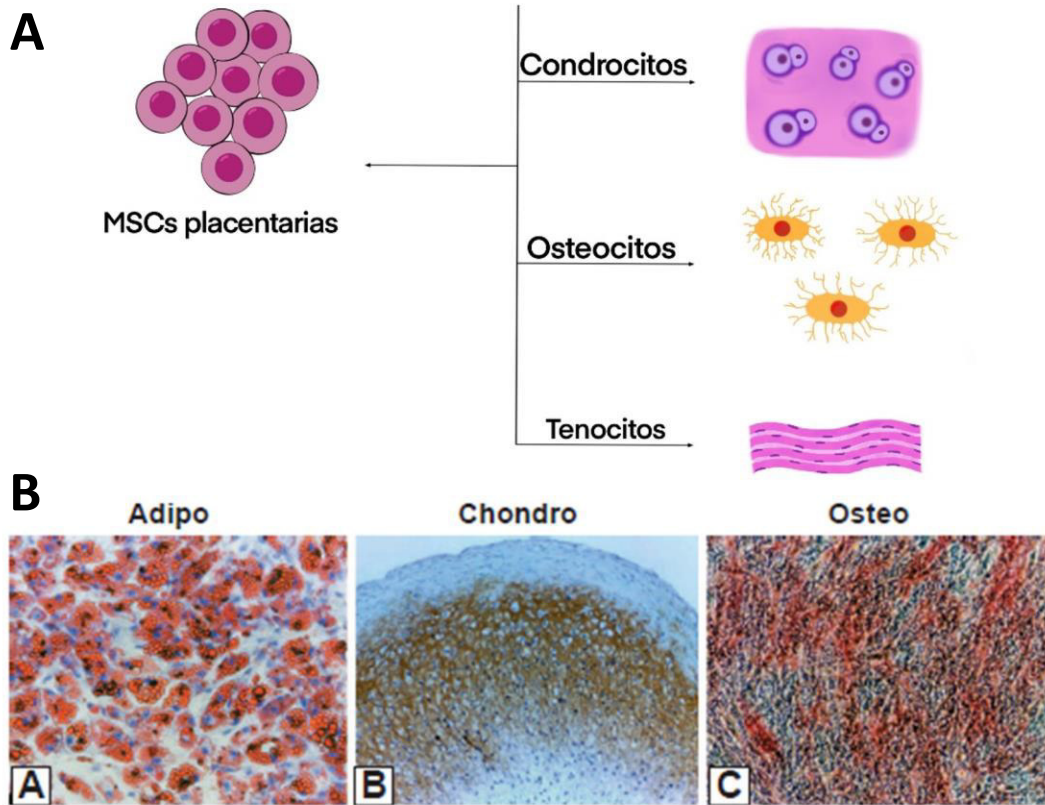
**Figura 3. Representación esquemática de la placenta.** Se señala las estructuras principales que conforman a la placenta como un órgano indispensable para el intercambio de metabolitos entre la sangre fetal y la sangre materna.

Las MSC aisladas de las vellosidades coriónicas mostraron tener el potencial de diferenciarse a linajes mesodérmicos como el linaje adipogénico del cual las células presentaron vacuolas lipídicas, mientras que su diferenciación a condrocitos se evidenció por la expresión de *Sox9* y caracterizada por los componentes de ECM como proteoglicanos y colágena tipo II, y por último su diferenciación osteogénica fue evidente por la actividad de fosfatasa alcalina, la

formación de nódulos y depósitos de calcio. Los autores además, resaltan una particular capacidad de diferenciarse al linaje neural (Igura et al., 2004).

Una de las ventajas de las MSC de la placenta es que pueden ser obtenidas en mayores cantidades, siendo además una fuente igual de viable como lo sería la medula ósea ya que tienen capacidades similares de proliferación y expansión (Fajardo-Orduña et al., 2017; Yen et al., 2005). Otra de las ventajas de la placenta sobre otras fuentes de MSC, es que tienen una preferencial capacidad de diferenciación al linaje condrogénico, por lo que es necesario evaluar si potencial condrogénico podría ser concomitante a establecer patrones complejos como los elementos esqueléticos.

Además, su obtención a partir de placenta provee una fuente abundante en células sin la necesidad de procedimientos invasivos y más importante, sin daño a la madre o al bebé y sin generar conflictos éticos en el proceso de su obtención. Por estas razones, las MSC placentarias son una alternativa viable para un estudio de su capacidad morfogénica y competencia a señales inductivas.



**Figura 4. Potencial de diferenciación de las MSC placentarias.** **A.** Representación esquemática del potencial de diferenciación de MSC de placenta. **B.** Capacidad multipotente *in vitro* de un grupo de MSC. (A). Adipogénesis evidenciada por tinción de las vacuolas lipídicas. (B). Condrogénesis muestra un fenotipo de condrocito y expresión de COL2A1. (C). Osteogénesis evidenciada por los depósitos de calcio. Modificada de (Pittenger et al., 1999).

A pesar del crecimiento exponencial de los estudios evaluando las MSC, aún no está claro por qué su potencial de diferenciación varía entre las distintas fuentes de aislamiento. Aún se está lejos de conocer si estas mismas capacidades se mantienen *in vivo* y como esto puede ser regulado. Es importante resaltar que aún es poco explorado si las MSC tiene algún tipo de capacidad morfogénica que las lleve a formar y/o integrarse a patrones espaciales que lleven finalmente a la formación de un tejido particular.

Tomando como base que las MSC tienen un potencial condrogénico y osteogénico, el cual es compartido con los progenitores de las extremidades para formar estructuras esqueléticas, este proyecto se enfoca en el estudio de la capacidad morfogénica de las MSC humanas provenientes de placenta en un contexto *in vivo*, utilizando a modo de fundamento lo que se conoce acerca del desarrollo embrionario de las extremidades. En este sentido, es esencial el conocimiento de la biología del desarrollo, y de los procesos de diferenciación que subyacen la formación de las extremidades.

### **4.3 Desarrollo embrionario de las extremidades**

El desarrollo de las extremidades comienza en etapas tempranas de la embriogénesis, es un proceso organizado y sincronizado de establecimiento de ejes anatómicos, diferenciación celular y morfogénesis (Gilbert, 2016).

Durante el desarrollo de las extremidades, diversos centros señalizadores regulan el establecimiento de los tres ejes anatómicos: el eje próximo-distal (PD) es regulado por la cresta ectodérmica apical (AER, por sus siglas en inglés *Apical Ectodermal Ridge*); el eje antero-posterior (AP) es regulado por la zona de actividad polarizante (ZPA, por sus siglas en inglés *Zone Polarizing Activity*), mientras que el eje dorso-ventral (DV) es regulado por ectodermo dorsal (Zeller et al., 2009) (Fig. 5). Concomitante con el establecimiento de los ejes, comienza la diferenciación hacia los tejidos presentes en la extremidad: cartílago, tendón, músculo y hueso.

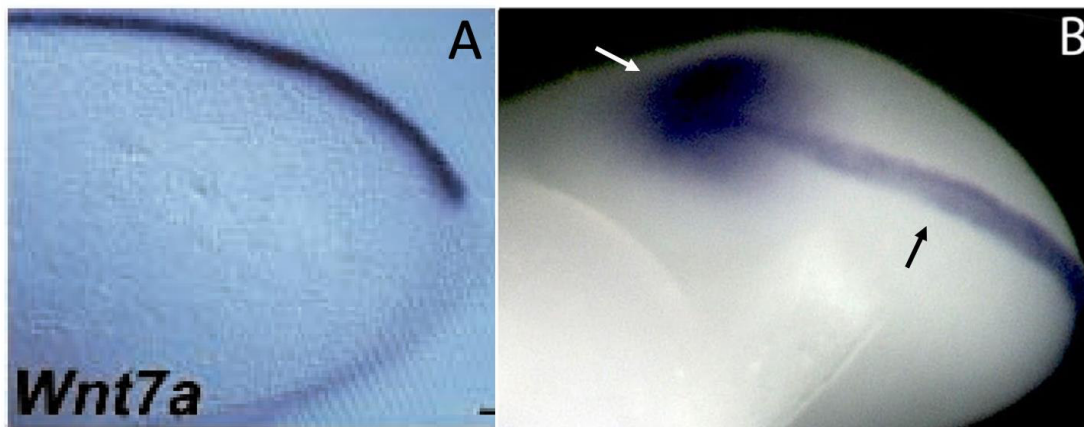
El desarrollo de la extremidad es un proceso conservado evolutivamente en todas las especies de vertebrados. Durante el desarrollo de las extremidades de distintas especies están presentes genes, factores de transcripción y factores de crecimiento que son homólogos y que dirigen el proceso de manera similar, no obstante, el cómo se regulan en el tiempo depende del organismo y su co-evolución con el ambiente.

Para su estudio, el desarrollo de las extremidades se puede dividir en 1) especificación del campo de la extremidad; 2) inducción del primordio; 3) establecimiento de los ejes en la extremidad embrionaria; 4) diferenciación y crecimiento de la extremidad y; 5) morfogénesis.

#### **4.3.1 Especificación del campo de la extremidad**

Las extremidades no se forman en cualquier lugar a lo largo del eje corporal, existen posiciones específicas donde comenzarán su desarrollo. El área prospectiva en la cual las células serán capaces de formar las extremidades se denomina *campo de la extremidad* (Gilbert, 2016). El establecimiento de este campo inicia con la regionalización de la placa lateral del mesodermo (LPM, por sus siglas en inglés *Lateral Plate of Mesoderm*) por la expresión de los genes *Hox*, los cuales son inducidos por el ácido retinoico (RA). Los genes *Hox* están implicados en diversos procesos del desarrollo embrionario, como el establecimiento del eje AP en el embrión regulando así, el asentamiento de patrones.





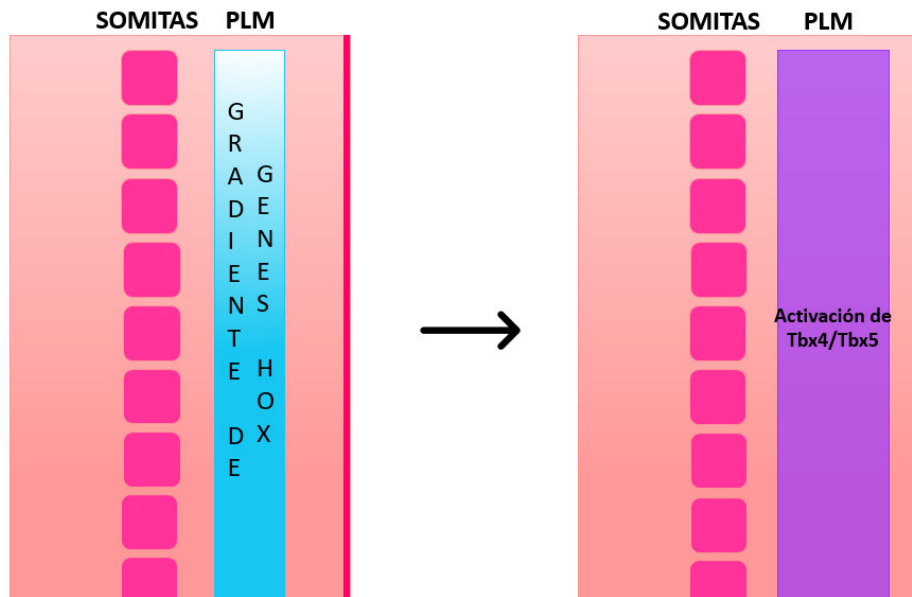
**Figura 5. Principales centros organizadores en el primordio de la extremidad y gradientes de morfógenos.** A. Hibridación in situ para *Wnt7a* en el ectodermo dorsal B. Se observa una hibridación in situ para *Shh* en la región posterior del primordio (flecha blanca) y *Fgf-8* en la AER (flecha negra). Modificado de (Marín-Llera et al., 2019).

Posteriormente, la LPM se divide en anterior y posterior, un paso indispensable para que se pueda establecer el campo de la extremidad (Kesseland & Gruss, 1991).

El gradiente de RA va de una mayor concentración en la zona posterior hacia la anterior con menor concentración, este gradiente regionaliza la LPM y la activación de los diferentes genes *Hox*, estableciendo los campos de las extremidades anteriores y posteriores (Tanaka, 2013).

Los genes *Hox4*, *Hox5*, *Hox6* y *Hox10* regularán la expresión de los genes *T-box* (TBX) (Fig. 6), factores de transcripción implicados en la especificación del primordio (Minguillon et al., 2012; Wu et al., 2008). En el embrión de pollo, *Tbx4* induce las extremidades anteriores y *Tbx5* las extremidades posteriores (Isaac et al., 1998).

A partir de las células indiferenciadas de la LPM, surge el primordio de la extremidad (Gilbert, 2016). *Tbx5* y *Tbx4* activan el factor de crecimiento FGF10 (por sus siglas en inglés, *Fibroblast Growth Factor*) expresado en las células de la LPM junto con los genes *Wnt* (*Wingless e Int*), formando parte de la señalización implicada en el desarrollo embrionario, en este caso *Wnt2b* en la extremidad anterior y *Wnt8c* en la extremidad posterior (Kengaku et al., 1998; Tanaka, 2013). Al mismo tiempo, estos factores mantienen la expresión de *Tbx5* y *Tbx4* a través de un loop de retroalimentación. La expresión de *Fgf10* se restringe en las regiones de las futuras extremidades favoreciendo la actividad mitótica y síntesis de DNA induciendo la proliferación celular (Ohuchi et al., 1997). Los genes *Tbx4* y *Tbx5* regulan también a *Fgf10* favoreciendo su expresión en los campos de la extremidad.

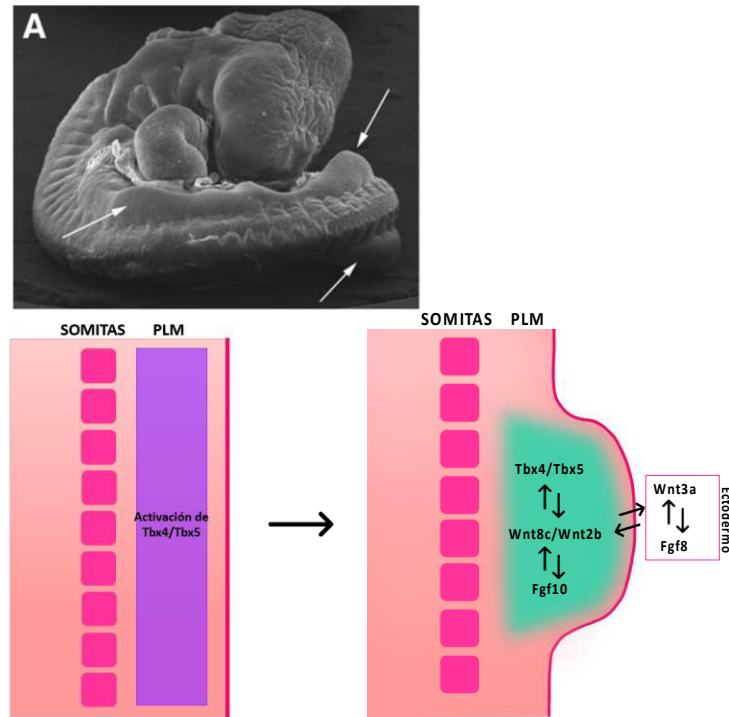


**Figura 6. Especificación del campo de la extremidad.** Representación ilustrativa de la especificación del campo de la extremidad por los genes *Hox* para la activación de *Tbx4/Tbx5* para la consecutiva inducción del primordio anterior y posterior, respectivamente.

#### 4.3.2 Inducción del primordio

En respuesta a la señalización constante de FGF10, el ectodermo adyacente empieza a expresar *Fgf8* e induce un engrosamiento que formará la AER, el centro señalizador del eje PD de la extremidad. Una vez establecida la AER, se establece un loop de retroalimentación positiva entre FGF10 y FGF8 que, junto con WNT3A, mantienen a las células mesodérmicas subyacentes a la cresta en un estado indiferenciado y proliferativo, a esta región se le conoce como *Undifferentiated Zone* o *Zona Indiferenciada (ZI)* (Fig. 7). Además de FGF8, durante el crecimiento del primordio, en el ectodermo se secreta FGF4 (Ohuchi et al., 1997).

Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de FGF8 es suficiente para inducir un primordio (Crossley et al., 1996). Una vez que comienzan a proliferar, las células mesenquimales se van alejando de las señales de la AER, lo cual implica abandonar el estado indiferenciado y comenzar la diferenciación hacia los distintos linajes propios de la extremidad (Sun et al., 2002).



**Figura 7. Inducción del primordio de la extremidad.** Activos los genes *Tbx*, favorecen la expresión de *Wnt8c/Wnt2b* en los primordios de las extremidades posteriores y anteriores respectivamente. *Wnt* activa a *Fgf10* en las células mesodérmicas y este a *Fgf8/Wnt3a* para generar la AER e inducir a las células adyacentes a proliferar. Modificado de (Montero et al., 2010)

#### 4.3.3 Establecimiento de los ejes anatómicos en la extremidad embrionaria

- Establecimiento del eje próximo-distal

Posterior a la inducción del primordio, se forma la AER como un epitelio especializado y pseudoestratificado, localizado a lo largo del eje AP que se encarga del desarrollo PD. En el eje próximo-distal, la extremidad se divide en tres regiones anatómicas: el estilópodo (húmero/fémur), el zeugópodo (cubito-radio/tibia-fíbula) y autópedo (metacarpo-carpo-dedos/metatarso-tarso-dedos).

Para la determinación de las tres regiones anatómicas, están implicados los genes *Hox*, entre ellos, *Hoxd9* a *Hoxd13* y *Hoxa9* a *Hoxa13* (Dollé et al., 1989; Yokouchi et al., 1995). A medida que crece el primordio, los genes *Hoxd13* y *Hoxa13* se mantienen en las zonas distales, *Hoxd11* y *Hoxa11* regulan la zona de zeugópodo, mientras que *Hoxd9* y *Hoxa9* establecen la zona proximal al eje corporal, su patrón de expresión está regulado por FGFs y la ZPA (Fromental-Ramain et al., 1996; Wellik & Capecchi, 2003).

Además, el RA también actúa de manera de antagónica a la señalización de FGF, induciendo la expresión de *Meis1* y *Meis2* estableciendo patrones proximales (Roselló-Díez et al., 2014). Un estudio demostró que PCR1 (por sus siglas en inglés, Polycomb Complex Repressive) y las señales de RA se antagonizan uno a otro, de forma que PCR1 reprime a *Meis2* durante el crecimiento del primordio en la zona distal; SHH y GREM1 al mismo tiempo, activan y regulan la expresión de la enzima Cyp26b1, la cual degrada el RA en el mesénquima distal (Probst et al., 2011; Yakushiji-Kaminatsui et al., 2018).

- *Establecimiento del eje antero-posterior*

Experimentos de injertos ectópicos de células mesodérmicas realizados por Saunders y Gasseling, fueron esenciales para demostrar que en la zona posterior del primordio esta presente un centro señalizador, responsable de la polarización del eje anteroposterior (Saunders, 1972). Más adelante, fue nombrada por Balcuns y colaboradores como ZPA (Balcuns et al., 1970).

La ZPA se injertó en la parte anterior del primordio y se observó que creaba una imagen especular con duplicación de los dígitos, lo que dedujo la presencia de un gradiente de morfógeno que va desde la zona posterior del primordio hacia la anterior. Posteriormente se demostró que *Sonic hedgehog (Shh)* es el morfógeno y que además, está implicado en el número de dígitos (Riddle et al., 1993).

Esta actividad polarizante se da por las interacciones antagónicas entre *Gli3* y *Hand2* previo a la señalización de SHH. GLI3 tiene una forma represora (GLI3R), la cual junto con el factor de transcripción HAND2 se co-expresan para desencadenar interacciones antagonistas que establecen los dominios mesenquimales, GLI3R en el área anterior y HAND2 en el posterior (Osterwalder et al., 2014). Gli3 es regulado positivamente por *Irx3/5* y *Sall4*, dos factores transcripcionales que interactúan con los genes *Hox5* para restringir la expresión de los genes *HoxD* y, la activación de Shh en el mesénquima posterior (Akiyama et al., 2015; Li et al., 2014; Xu et al., 2013).

Se demostró que es necesaria la expresión de los parálogos *Hox9* para activar la expresión de *Hand2* y *Shh* en el mesénquima del primordio de la extremidad anterior, mientras que el factor de transcripción del homeodominio *LIM Isl1* es necesario para la activación de *Hand2* en el campo de la extremidad posterior (Itou et al., 2012; Xu & Wellik, 2011). Shh

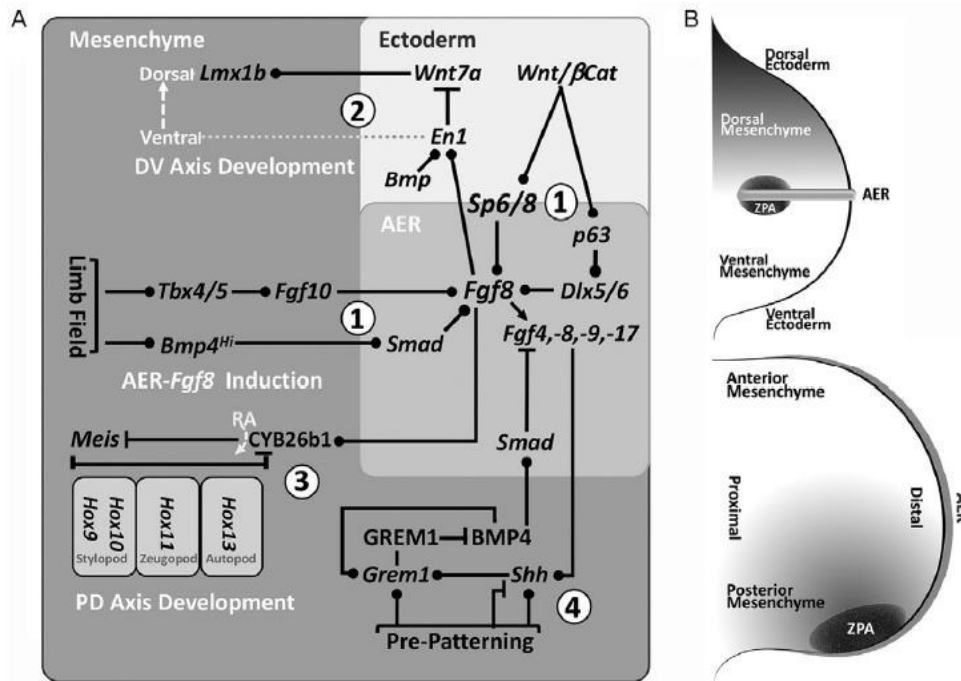
proveniente de la ZPA induce las estructuras más posteriores (cúbito y los dígitos 2 a 5) y las estructuras anteriores como el dígito 1, son inducidos por los reguladores transcripcionales *Sal-like4* (SALL4), *Tbx5* y *Hox* (Koshiba-Takeuchi et al., 2006; Montavon et al., 2008).

- *Establecimiento del eje dorso-ventral*

Se ha demostrado que la AER crea un límite entre el ectodermo ventral y el ectodermo dorsal. BMP4 actúan de manera conjunta con la señal de WNT/ $\beta$ -catenina presente en el ectodermo para establecer la polaridad DV (Soshnikova et al., 2003). En adición a esto, se requieren SP6 y SP8 junto con las señales de BMP para activar el factor de transcripción del *homeodominio En1*, responsable del carácter ventral de la extremidad (Haro et al., 2014). EN1 reprime a *Wnt7a* del ectodermo ventral. Una vez activa la señalización de WNT7A, induce la expresión del gen *Lmx1* (*genes LIM homeobox*), un regulador de destino celular para desarrollar la dorsalización de la extremidad (Grieshammer et al., 1996; Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998).

Esta expresión diferencial de la zona ventral y el área dorsal generan el fenotipo DV durante el inicio del desarrollo del primordio de la extremidad. Además, LMX1b es parte de una red de factores de transcripción LIM que, junto con LHX2 y LHX9 controlan de manera coordinada la expresión de *Shh*, *Grem1* y *Fgf10* durante el crecimiento y el patrón distal del primordio de la extremidad (Tzchori et al., 2009).

Los tres centros señalizadores (AER/ZPA/Ectodermo) controlan su expresión mutuamente creando frentes en el primordio donde convergen y establecen límites, creando un loop de retroalimentación para el correcto patrón de la extremidad. En la Figura 8, se muestra un resumen de las interacciones moleculares de su convergencia para el establecimiento de los tres ejes.



**Figura 8.** Señalización AER-FGF induce genes que establecen el patrón del eje DV y el crecimiento coordinado de los ejes PD y AP. La expresión de Fgf8 se inicia mediante la señalización de FGF-10 junto a la señal ectodérmica WNT, que también influye en la polaridad del eje DV. Los AER-FGFs son reguladores del crecimiento y el patrón en el eje PD, además del establecimiento del sistema de señalización SHH/GREM1/AER/FGF en el mesodermo del primordio de la extremidad posterior. Recuperado de (Zuniga & Zeller, 2020).

#### 4.3.4 Diferenciación y crecimiento de la extremidad

Al mismo tiempo que se establecen los ejes embrionarios, inicia el proceso de diferenciación celular. Las células mesodérmicas que conforman el primordio de la extremidad provienen de dos sitios diferentes: la LPM y el miotomo. Las células del miotomo migran desde las somitas hacia el primordio y se organizan en diferentes zonas a lo largo del primordio. Mientras que células de la LPM se diferencian hacia cartílago, tejido óseo o tendón dependiendo de las señales inductivas que reciban, las células del miotomo se diferenciarán en el tejido muscular de la extremidad.

Inicialmente, todas las células del primordio son expuestas a las señales de FGF8 y WNT3A que vienen de la AER, manteniéndolas en estado indiferenciado y proliferativo. Otros trabajos han demostrado que factores como FGF4, FGF9 y FGF17 están expresados en la AER de forma que potencializan la señal de FGF8 (Mariani et al., 2008; Niswander & Martin, 1992; Savage et al., 1993). Las células presentes dentro del primordio comienzan a proliferar, alejándose de la ZI y dejando de recibir las señales de la AER, en este momento las células empiezan a formar condensaciones condrogénicas formando las estructuras más próximas al eje corporal, siendo las estructuras distales las últimas en formarse (Summerbell, 1974).

- *Condrogénesis en la extremidad*

Las interacciones entre la AER y el mesodermo en el primordio son indispensables para que los factores secretados provenientes tanto en el mesénquima como en el ectodermo embrionario puedan establecer sus frentes de regulación y se genere una señalización estable. Las distintas señales que reciben las células como SHH, TGF- $\beta$ /BMP y WNT inducen su condensación en una posición específica de tal forma se crea un patrón característico de la extremidad (Capdevila & Belmonte, 2001).

El cartílago es de los primeros tejidos en diferenciarse. Las condensaciones celulares comienzan como indicio del inicio la diferenciación hacia cartílago, de esta forma que crearán un molde para formar los elementos esqueléticos de un organismo. Una vez inducida la expresión de los genes maestros de la condrogénesis, comienza la condensación de las células en el centro del primordio y, su diferenciación a condroblastos, las células precursoras encargadas de la síntesis de los productos de ECM (Fig. 9A) (Summerbell et al., 1973).

Posteriormente, los condrocitos detienen su proliferación e inician un proceso de hipertrofia sometiéndose a un aumento de tamaño, y mineralización de su matriz extracelular (ECM) para después, someterse a un proceso de muerte celular y dejar un molde que será invadido por osteoprogenitores gracias a la invasión de vasos sanguíneos dando paso al primer centro de osificación endocondral. Además, parte de este cartílago se mantiene como definitivo durante la vida adulta de un individuo.

Existen también interacciones célula-célula necesarias para que comience la condrogénesis. Moléculas de adhesión como N-cadherina y N-CAM (por sus siglas en inglés *Neural Cell Adhesion Molecule*) y también, las proteínas fibronectina y tenascina están involucradas en

las condensaciones precartilaginosas (Chimal-Monroy & Díaz de León, 1999). El proceso de condrogénesis es inducido por la expresión de genes como *Sox9*, *Sox8*, *Sox10*, *Sox6*, *L-Sox5*, *Agrecano* y *Col2a1* (Chimal-Monroy et al., 2003). Los principales factores que inducen la condrogénesis pertenecen a la superfamilia TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ , BMP y activinas), quienes inducen la expresión de *Sox9*, perteneciente a la familia de los factores de transcripción Sox (Chang et al., 1994; Chimal-Monroy & Díaz de León, 1999; Lefebvre et al., 1998). Otro factor perteneciente a la familia de los TGF- $\beta$ , el factor de diferenciación de crecimiento 5 (GDF-5 por sus siglas en inglés, *Growth Differentiation Factor 5*) expresado en el primordio en el desarrollo temprano de las extremidades, tiene un papel importante en etapas iniciales de la condrogénesis, promoviendo las condensaciones incrementando la adhesión celular (Buxton et al., 2001).

La vía de Wnt, a través de la activación de  $\beta$ -catenina actúa inhibiendo la expresión de *Sox9* o bien, formando un complejo proteico con este factor de transcripción, causando su degradación y manteniendo la etapa indiferenciada de las células progenitoras (ten Berge et al., 2008). Estudios han sugerido que la señalización continua de Wnt/ $\beta$ -catenina en elementos esqueléticos cartilaginosos nacientes bloquea la hipertrofia de condrocitos y la osificación endocondral, mientras que la señalización que comienza en etapas posteriores estimula la hipertrofia y la osificación, lo que indica que las funciones de Wnt/ $\beta$ -catenina están reguladas por el desarrollo (Tamamura et al., 2005).

*Sox9* es el marcador más temprano de diferenciación condrogénica, regula el proceso de maduración de los condrocitos, activando la expresión de los genes que codifican las proteínas de ECM, como Agrecano (ACAN), colágena de tipo II (COL2A1), entre otros tipos de colágenas.

También se ha reportado que *Hif1- $\alpha$*  es importante para la activación de *Sox9*. *Hif1- $\alpha$*  es un complejo de factores de transcripción inducible por hipoxia. HIF1 es un heterodímero que consiste en la unidad *Hif1- $\alpha$*  sensible a oxígeno y la unidad constitutiva *Hif1- $\beta$* . En condiciones de hipoxia *Hif1- $\alpha$*  se estabiliza, disminuyendo su degradación mediada por proteasoma. Esto permite su unión a HIF1- $\beta$  para potenciar la transcripción de genes blanco (Amarilio et al., 2007).

- *Hipertrofia y osificación endocondral*



Las células exhiben el fenotipo de condrocito y secretan moléculas de ECM para sustituir la colágena tipo I por *Col2a1*, colágena tipo VI (*Col6a1*), colágena tipo XI (*Col11a1*), siendo el tipo II el más abundante (Fig. 9B). El tejido aumenta su complejidad conforme avanza el desarrollo de un organismo y la ECM entre los condrocitos confiere flexibilidad y rigidez (Keene et al., 1988; Poole et al., 1980).

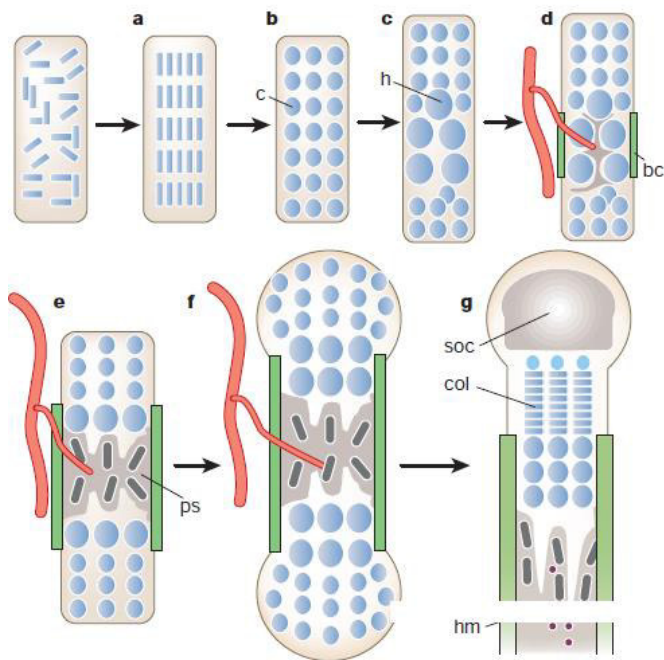
Los proteoglicanos como Versicano, Perlecano, Sindecano-3 son sustituidos por Agrecano, siendo este último el más abundante (Kamiya et al., 2006). Posteriormente, se forma el pericondrio que rodea al cartílago proporcionando nutrimentos al tejido e induciendo la proliferación y la hipertrofia (Fig. 9C) (Colnot et al., 2004). Una vez que la proliferación de los condrocitos se detiene, muestran un carácter hipertrófico, es decir, un aumento de tamaño e inician la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés *Vascular Endothelium Growth Factor*) que favorece la invasión de vasos sanguíneos. Células osteoblásticas migran hacia el pericondrio y forman un collar de tejido óseo alrededor del cartílago que será el periostio (Fig. 9D) (Gerber et al., 1999). En los condrocitos hipertróficos está presente colágena tipo X (*ColXa1*), rodeada de una ECM calcificada. Después, comienza la apoptosis de los condrocitos y la invasión de osteoprogenitores para finalmente, desarrollar una matriz de hueso (Fig. 9E) (Gerber et al., 1999).

Los principales factores de crecimiento involucrados son los BMP (por sus siglas en inglés, *Bone Morphogenetic Proteins*) induciendo la formación de cartílago, tejido conjuntivo y hueso. BMP-2, 3, 4, 5, y 7 están expresados en el pericondrio, BMP-7 en el condrocito proliferante y más adelante, BMP-2 y BMP-6 en el condrocito hipertrófico (Chimal-Monroy et al., 2003). De manera antagónica a los BMP, los FGF actúan favoreciendo la hipertrofia y la vascularización de la extremidad (Hung et al., 2007).

*Runx2*, es el principal gen asociado a la diferenciación osteogénica, es indispensable para la hipertrofia de los condrocitos, dar lugar a la formación de los osteoblastos y la osificación. Existe un equilibrio entre *Sox9* y *Runx2* que determina el destino de diferenciación de las células (Eames et al., 2004). Por otro lado, GDF5 desempeña un papel en la formación de huesos, ligamentos y articulaciones, expresándose en la interzona de los sitios de formación de articulaciones (Jin & Li, 2013). El proceso de sustitución del esqueleto cartilaginoso por el esqueleto óseo se conoce como osificación endocondral, y sucede en la formación de la mayor parte de los huesos del organismo, con algunas excepciones en los huesos del cráneo o la clavícula.

**Figura 9. Representación esquemática del proceso de condrogénesis y osificación endocondral.**

**a.** Condensación de células mesodermales. **b.** Posterior diferenciación a condrocitos. **c.** Adquisición del fenotipo hipertrófico. **d.** Las células del pericondrio se diferencian en osteoblastos y forman el periostio. Los condrocitos hipertróficos comienzan a secretar una matriz mineralizada, invasión de vasos sanguíneos y mueren por apoptosis. **e.** Osteoblastos acompañados de la invasión vascular, comienzan a formar la esponjosa primaria. **f.** y **g.** Los condrocitos proliferan para alargar el hueso. Los osteoblastos de la esponjosa primaria son precursores del hueso trabecular y osteoblastos del cuello óseo se convierten en hueso cortical. Recuperado de (Kronenberg, 2003)



- *Tenogénesis en la extremidad*

Los tendones de la extremidad están compuestos de fibras organizadas distribuidas en el eje DV. Para que las células se organicen en fibras, los progenitores tendinosos se inducen directamente debajo del ectodermo en localizaciones que siguen el crecimiento PD del primordio (Gilbert, 2016). Los progenitores se alinean entre los progenitores de músculo y las condensaciones de cartílago. Después, estos progenitores tendinosos comienzan a condensarse en forma de una lámina mesenquimatosa y, a secretar proteínas de ECM dando

lugar al blastema tendinoso (Murchison et al., 2007). A partir de estos blastemas se desarrollarán los diferentes tendones presentes en la extremidad.

Los tenocitos comienzan la síntesis y secreción de una ECM rica en colágenas, principalmente colágena tipo I. Las moléculas se unen y enlazan formando un conjunto fibroso en posición paralela que formará las sub-fibrillas y fibrillas. Posteriormente, formarán las fibras primarias del tendón que estarán envueltas en un endotendón, formando el fascículo envuelto por el epitenon que formarán el tendón maduro (Lorda Diez, 2010).

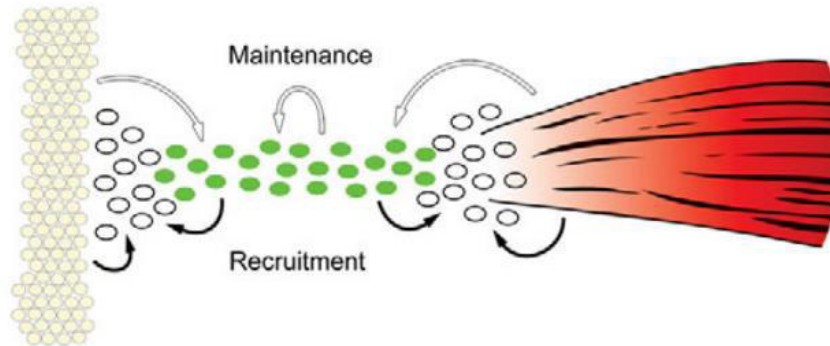
El tendón está constituido por fibras de colágena como lo son fibrilares-reticulares, los FACIT (por sus siglas en inglés *Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices*) (Young et al., 2000) y proteoglicanos como son SLRP (por sus siglas en inglés *Small Leucine-Rich Proteoglycan*), Decorina, Biglicano, Lumicano, Fibromodulina (Vogel & Heinegard, 1985). También, están presentes glicosaminoglicanos, como son Agrecano, Versicano y otras glicoproteínas como son Fibronectina, Laminina, Tenomodulina y Tenascina-C (Lorda Diez, 2010). Las diferencias entre tendones radican en las diferentes proporciones de estos elementos.

El gen *Scleraxis (Scx)*, gen maestro de los progenitores tendinosos, se expresa en etapas tempranas de la determinación de este linaje (Schweitzer et al., 2001). FGF8 en la AER y FGF10, 17, 18 en el mesénquima del primordio inducen la expresión de *Scx*, mientras que los BMP la inhiben (Brent et al., 2003; Brent et al., 2005). La maduración final del tejido en los tendones proximales y medios depende de FGF4 presente en el músculo (Fig. 10) (Brent et al., 2005; Edom-Vovard et al., 2002; Tozer & Duprez, 2005). A diferencia de estos tendones, los tendones distales pueden completar su diferenciación de manera autónoma.

Después de la aparición de *Scx* (E9.5) en el embrión de ratón, la expresión de *Mkx* en los progenitores tendinosos comienza en E12.5. En E13.5 y E14.5 se tiene una expresión alta de *Mkx*, etapas en las que los progenitores del tendón experimentan condensación y diferenciación (Liu et al., 2014).

El tendón es uno de los tejidos conjuntivos de la extremidad que, junto con el tejido muscular, confieren capacidades elásticas y proporcionan fuerza mecánica y motriz.

Los tendones tienen puntos de unión con el músculo y con el hueso, llamados unión miotendinosa y unión osteotendinosa, respectivamente. Dependiendo del músculo del que estemos hablando es el tipo de tendón que presenta, es decir, músculos grandes en huesos largos que generan fuerzas con grandes presiones o resistencias, presentan tendones cortos y amplios mientras que los músculos en los dedos con fuerzas delicadas y sutiles tienen tendones largos y delgados.



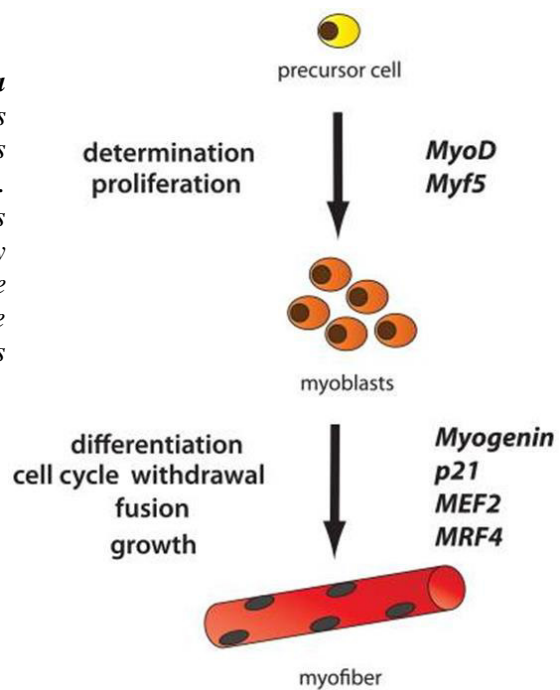
**Figura 10. Mantenimiento y reclutamiento de progenitores de tendón por factores TGF-β.** Los progenitores de tendones son capaces de alinearse entre las condensaciones condrogénicas y células musculares dependientes de la señal de TGFβ (flechas blancas). Se sugiere que la señal de TGFβ proveniente de células musculares y los condrocitos tienen influencia sobre las células mesenquimales adyacentes (blancas), de manera que las recluta para la diferenciación de las células hacia el linaje tenogénico (flechas negras). Recuperado de (Pryce et al., 2009)

- *Miogénesis en la extremidad*

El músculo de la extremidad se desarrolla a partir de células de las somitas, más específicamente de la zona del miotomo (Gilbert, 2016). Tejidos adyacentes como el ectodermo y la LPM, secretan WNT, BMP4 y FGF5 que inducen al miotomo hipaxial para que las células expresen *MyoD* y comiencen su diferenciación a mioblastos (Pownall et al., 2002). De la misma manera, diversos factores de crecimiento inducen el factor de transcripción *Pax3*, el cual activa al gen *MyoD*, perteneciente a la familia de los factores de transcripción de proteínas miogénicas BHLH (por sus siglas en inglés *Basic helix-loop-helix*), para el desarrollo de los músculos hipaxiales (Maroto et al., 1997). Estas proteínas se unen de manera similar al DNA, activan genes específicos del músculo y en el caso de *MyoD*, activa el gen fosfoquinasa creatina específico del músculo (Fig. 11) (Lassar et al., 1989).

En presencia de FGF, los progenitores musculares detienen su división, secretan fibronectina en su ECM y se unen a través del receptor de fibronectina  $\alpha 5\beta 1$ , la alineación en cadena de los mioblastos esta mediada por glucoproteínas, cadherinas y CAM (Menko & Boettiger, 1987). Los mioblastos comienzan a sintetizar proteínas miogénicas bHLH después, inician un proceso de alineamiento y se fusionan formando miotubos multinucleados por la disociación de las membranas celulares (Gilbert, 2016). La fusión termina por ionóforos de calcio que transportan los iones a través de las membranas celulares. Una vez que los mioblastos son capaces de fusionarse, la proteína miogenina se activa y regula los genes de diferenciación de las células (Gilbert, 2016).

**Figura 11. Principales etapas de la miogénesis en la extremidad.** Las células precursoras de las somitas son inducidas por MyoD y Myf5 para determinarlas al linaje miogénico y dar lugar a mioblastos. Durante las últimas etapas de la miogénesis, los mioblastos se diferencian, detienen el ciclo celular y se fusionan para formar miofibras. El factor de transcripción miogenina juega un papel clave durante estas últimas etapas de la miogénesis Recuperado de (Apponi et al., 2011).



#### 4.3.5 Morfogénesis de la extremidad

Concomitante con el proceso de diferenciación celular, la muerte celular es otro evento que se está llevando a cabo en la extremidad para esculpir y moldear las estructuras esqueléticas. Las áreas de muerte celular están finamente reguladas y desempeñan una variedad de funciones incluyendo esculpir la morfología general de la extremidad, la forma de los músculos y los tendones, y establecer las zonas de formación de las articulaciones (Montero & Hurlé, 2010).

Mediante el proceso de apoptosis, células posicionadas en lugares determinados morirán para establecer la separación de las articulaciones en el estilópodo, la separación de los dos huesos

del zeugópodo y los distintos huesos del autópedo. En especies con dedos libres como el ser humano, esto involucra también la separación de los dígitos mediante la muerte celular del interdígito (Wolpert, 2002).

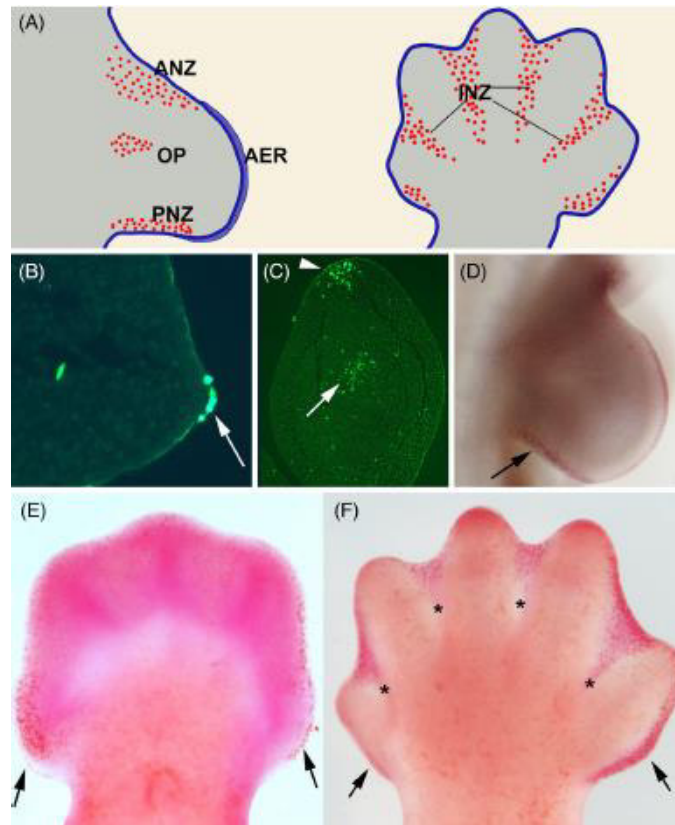
En la extremidad en desarrollo de aves, se pueden identificar cuatro zonas de muerte celular: la “*zona necrótica interdigital*” (específica del interdígito)(Fig.12F), el “*parche opaco*” (localizado en el centro del primordio entre dos condensaciones precondrogénicas) que separa el cúbito y el radio entre sí (Fig.12C) y las “*zonas necrótica anterior y posterior*” (localizados en los márgenes anterior y posterior del primordio), las cuales ayudan a esculpir la extremidad y definir las estructuras (Fig. 12C y D) (Montero et al., 2020). Estas zonas se pueden apreciar en la figura 12 a diferentes etapas del desarrollo en el primordio de la extremidad con la técnica de TUNEL y la tinción con rojo neutro.

El proceso de apoptosis está regulado por las señales de FGF provenientes de la AER, las cuales actuarán como una señal antagonica a los BMPs, inhibiendo la diferenciación y promoviendo la proliferación (Montero et al., 2008). Las señales apoptóticas están dadas por las proteínas BMP2, BMP4, BMP5 y BMP7 expresadas en las zonas de muerte celular.

La acción combinada de FGFs y BMPs inducen la expresión de los genes *Msx2*, un represor transcripcional que establece un equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis y *Snail*, un factor de transcripción que promueve la represión de la molécula de adhesión E-Cadherina (Montero et al., 2001). Se mencionó anteriormente que los BMPs también promueven la condrogénesis, y la diferente respuesta de los BMPs dependerá de los receptores, BmpRIb controla la condrogénesis y BmpRIa, la apoptosis (Lorda Diez, 2010). De la misma forma, la proteína GREMLIN, una glicoproteína parte de la familia DAN e inducida por la AER y la ZPA, actúa como un antagonista de la señalización de BMP restringiendo las zonas apoptóticas (Merino et al., 1999).

En conclusión, existe una alta regulación de las señales que mantienen a las células en un estado indiferenciado y proliferativo para que, en el tiempo adecuado las células interpreten segundas señalizaciones que las dirijan a ser reclutadas a algún linaje presente en la extremidad y formar parte de un tejido específico o bien, sufran muerte celular para permitir el moldeado, movimiento y el correcto desarrollo de los elementos esqueléticos. Para la correcta morfogénesis de la extremidad embrionaria es necesaria una interpretación adecuada de las

señales y es indispensable la interacción ectodermo-mesodermo, de tal manera que pueda existir una coordinación entre los frentes de regulación.



**Figura 12. Muerte celular mesodérmica y ectodérmica en la extremidad embrionaria.** *A.* Ilustración de las principales áreas de muerte celular de la extremidad (puntos rojos): la ANZ, la PNZ, el OP y las zonas necróticas interdigitales en embrión de ratón. *B.* Corte longitudinal del primordio de la extremidad de pollo (24HH), se observa células apoptóticas positivas para TUNEL en el AER. *C.* Corte transversal del primordio de la extremidad (23HH), muestra células apoptóticas en la ANZ y el OP. *D.* Tinción rojo neutro del primordio de la extremidad (22HH) que muestra la PNZ. *E.* y *F.* Tinción rojo neutro del autópodo de ratón en el día 13 y 14 pc. Las flechas muestran la ANZ y las PNZ y los asteriscos las zonas necróticas interdigitales. Recuperado de (Juan A. Montero et al., 2020).

#### 4.4 Extremidades recombinantes

La manipulación experimental en el desarrollo embrionario ha permitido generar un mejor entendimiento de las interacciones celulares que regulan la formación de las distintas estructuras u órganos. Entre estas técnicas están retirar algunos segmentos de tejido, trasplante y ablación celular, combinación de células de distintas especies, colocación de perlas embebidas en fármacos para imitar el proceso de desarrollo (Ohuchi & Noji, 1999; Summerbell, 1974; Riddle et al., 1993; Zwillig, 1964). De estas manipulaciones experimentales resalta la técnica de las “Extremidades Recombinantes” (RL por sus siglas en inglés, Recombinant Limb). Esta técnica ha permitido entender las interacciones ectodermo-mesodermo en el establecimiento de patrones, señales y procesos de diferenciación dentro de las extremidades embrionarias.

Zwiling desarrolló esta técnica en 1964 con el objetivo de poder estudiar las características del mesodermo, su aportación en el desarrollo de la extremidad y sus interacciones con el ectodermo.

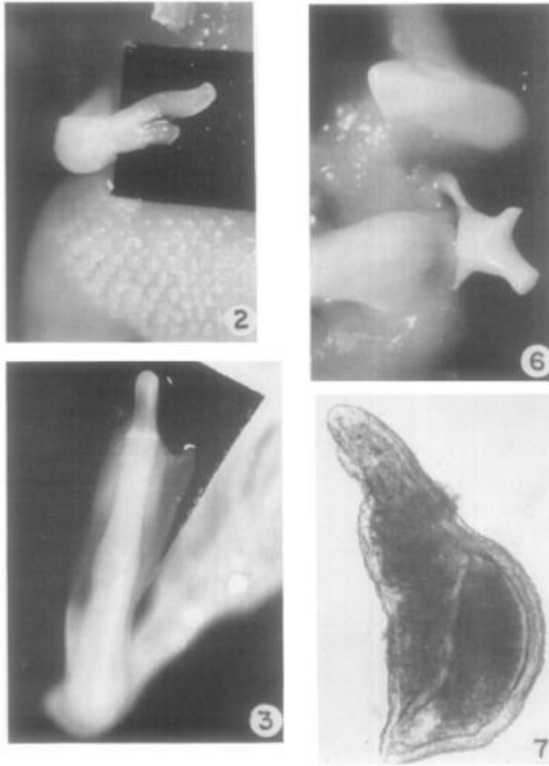
Este procedimiento consiste en cortar el primordio de la extremidad de embriones de *Gallus gallus*, después los primordios se someten a digestiones enzimáticas para separar el mesodermo del ectodermo que recubre el primordio. Posteriormente, el mesénquima se fragmenta o disocia para después, volverlo a colocar dentro del ectodermo y ser implantado en un embrión hospedero para permitir que continúe su desarrollo. Mediante estos procesos fue posible estudiar las interacciones de células que, una vez disociadas y/o fragmentadas son capaces de interpretar las señales en un orden que no está en su programa “normal”. Al mismo tiempo, fue una metodología que ayudó a dar un seguimiento a los procesos de diferenciación y morfogénesis de las extremidades (Zwiling, 1964).

Zwiling sometió el mesénquima a distintos procedimientos: fragmentación de pequeños pedazos, disociación de las células para cambiar el acomodo celular y las señales que recibían. Observó los fenotipos obtenidos de estos injertos: las ER formaban estructuras distintas unas de otras, sin embargo, él pudo sugerir que las propiedades para restablecer una asociación con el ectodermo no se veían alterada por la disociación o la fragmentación (Fig.13) (Zwiling, 1964).

Las extremidades recombinantes ayudaron a entender el comportamiento celular, es decir, como las células son capaces de compensar la pérdida de ciertos grupos celulares que son



fuente de señales o que darían lugar a estructuras futuras y, sobre todo, como la orquestación de señales está regulada para dar un orden y un lugar a cada célula dentro del primordio de la extremidad.



**Figura 13. Extremidades recombinantes como modelo de estudio.** Las imágenes con el número 2 y 6 muestran la ER con células de pollo, la número 3 una ER con células mesodérmicas de pato y la número 7 un ectodermo relleno con el pellet de células. Recuperado de (Zwilling, 1964).

#### **4.4.1 Aportaciones de las extremidades recombinantes al entendimiento del desarrollo de la extremidad**

Con esta técnica se logró un mejor entendimiento del proceso de desarrollo de la extremidad, por ejemplo, se evaluó el papel inductivo de la ZPA para el establecimiento de la asimetría de la extremidad. En este trabajo, se evaluó que la disociación del mesénquima completo generaba una estructura simétrica en la extremidad pero, si se injertaba un pedazo de la ZPA sin disociar, la asimetría se recuperaba, dando pauta a su papel en el establecimiento de los patrones en el primordio (Frederick & Fallon, 1982).

Más adelante, se estudió como la disgregación de las células influía en la expresión de genes involucrados en el establecimiento de patrones y como esto repercutía en el fenotipo de la extremidad como son por ejemplo, los genes *Hox* (Ros et al., 1994).

El uso de la técnica de ER también ha contribuido para entender el comportamiento de las células del miotomo que migran para desarrollar el músculo. Evaluando la expresión de *Pax3*, un factor de transcripción involucrado en la migración de los precursores y *MyoD* que determina el linaje miogénico, se observó que la ER no permitía la correcta formación del tejido muscular inhibiendo su migración hacia las estructuras distales (Fernandez-Teran et al., 1999).

Se logró deducir que la AER es capaz de dirigir el crecimiento y el patrón proximal-distal mediante la expresión de los genes *Hoxa-11* y *Hoxa-13*. En ausencia de la ZPA, el fenotipo de las ER era simétrico y presentaban una baja expresión de *Bmp* en el mesodermo. Concluyeron que, la ZPA regula la expresión de *Bmp* y la formación de patrones a lo largo del eje anteroposterior (Piedra et al., 2000).

Además, las ER se han podido realizar combinando los componentes del primordio de la extremidad de diferentes especies de vertebrados. Zwillig, en su ensayo combinó el mesodermo de pato con el ectodermo de pollo, en este injerto pudo observar que las características de la especie son retenidas en el mesodermo, mientras que el ectodermo permitía la continua formación de segmentos distales (Zwillig, 1964). Las ER ensambladas a partir de células de pollo y tortuga, pollo y ratón han logrado continuar su desarrollo hasta generar una extremidad identificable (Elisa Piedra et al., 2000).

Fallon y Simandl en 1984, combinaron el ectodermo de reptiles (tortuga y largartija) con el mesodermo de embriones de pollo mutantes “limbless”. Al injertar el ectodermo de reptil el loop de retroalimentación se reestablecía, por lo que concluyen que las señales involucradas en el crecimiento están conservadas entre reptiles y aves (Fallon & Simandl, 1984).

De manera similar, Kuhlman y Niswander evaluaron las señales moleculares en las interacciones epitelio-mesodermo, la inducción y el correcto establecimiento de la AER haciendo ER con células mesodérmicas de pollo y ectodermo de ratón. Ellos concluyeron que cuando la AER o el mesénquima no se forman correctamente se pierde el loop de retroalimentación entre ellos por lo tanto, afecta el correcto desarrollo de la extremidad (Kuhlman & Niswander, 1997).

Estos ensayos han mostrado la capacidad de formar ER interespecie ya que se generan quimeras muy similares a una extremidad mostrando características de ambas especies en algunos casos. Además, ayudaron a demostrar que el desarrollo embrionario de la extremidad

es un proceso conservado evolutivamente entre las especies de vertebrados. Los centros señaladores, las señales moleculares que inducen y comprometen a las células para el proceso de diferenciación, así como las estructuras esqueléticas generadas de la misma forma los genes, factores de transcripción y los reguladores del proceso que lo controlan son similares entre los organismos.

#### **4.4.2 Estudio del potencial de diferenciación y morfogenético de las MSC de placenta utilizando la técnica de ER**

Con base en los ensayos mencionados que comprobaron la capacidad de realizar las ER interespecie, se sugiere que es posible modificar la técnica para colocar dentro del ectodermo del primordio de extremidad de pollo MSC humanas obtenidas de placenta.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que es posible combinar células mesodérmicas de ratón y el ectodermo de pollo. Se comprobó la existencia de subpoblaciones dentro de las células mesodérmicas del primordio de ratón, utilizando marcadores empleados para la caracterización de MSC, se encontró una subpoblación positiva para SCA1. Células del primordio de ratón electroporadas con SCA1 y evaluadas en el sistema de extremidades recombinantes, demostró la validez de esta técnica para evaluar el comportamiento *in vivo* de una población celular sin importar que se trate de especies distintas (Marín-Llera, 2018). Posteriormente, se utilizó la técnica de extremidades recombinantes para evaluar la capacidad de diferenciación y morfogénesis de MSC aisladas a partir de sangre de cordón umbilical (García-García, 2022). En este trabajo se demostró la sobrevivencia de las MSC en un injerto por 24, 48 y 72 horas. Además, las MSC dirigieron su proceso de diferenciación hacia el linaje tenogénico, ya que se comprobó una elevada expresión de *Scleraxis*, en comparación con los genes de los linajes condrogénico, *Sox9* y osteogénico, *Runx2*.

Con esta información, es posible utilizar esta técnica como una herramienta para estudiar el potencial de diferenciación y morfogénesis de MSC obtenidas de placenta en un contexto *in vivo*.

Para poder adaptar la técnica de ER, las MSC placentarias se utilizarán para rellenar los ectodermos embrionarios así poder utilizar las ER como un sistema con señales inductivas que nos permita evaluar el potencial de diferenciación y morfogénesis. Por lo tanto, dirigir a las MSC de placenta a organizarse en un patrón estructural. Bajo estas condiciones, se seguirá

el comportamiento de las MSC en el tiempo mientras reciben señales embrionarias del ectodermo, las mismas a las que están sometidas las células mesodérmicas dentro del primordio de la extremidad.

## **Pregunta de investigación**

¿Las MSC placentarias son capaces de interpretar señales del ectodermo de la extremidad embrionaria para comprometerse hacia los linajes presentes en la extremidad y además generar un patrón morfogenético?

## **5. Justificación**

Las MSC de placenta han sido estudiadas debido a su multipotencia y capacidad inmunorreguladora. No obstante, la mayoría de estos estudios se han realizado *in vitro*. Debido a su potencial multilinaje relacionado con la formación de elementos esqueléticos, el estudio de estas células ha sido de interés para la medicina regenerativa. Sin embargo, es necesario evaluar en un ambiente *in vivo*, su capacidad de responder a señales inductivas que dirijan su diferenciación hacia distintos linajes y comprobar su potencial morfogenético. El estudio de este potencial de las MSC utilizando el modelo de ER es de ayuda para el entendimiento de estos procesos, lo cual, es importante sentar las bases biológicas de las MSC antes de que pueda ser considerado usarlas de manera segura en estas áreas de la medicina.

## **6. Hipótesis**

Las MSC humanas provenientes de placenta tienen la capacidad de interpretar señales del ectodermo de la extremidad embrionaria para comprometerse hacia los linajes presentes en la extremidad y organizarse espacio-temporalmente para formar estructuras complejas.

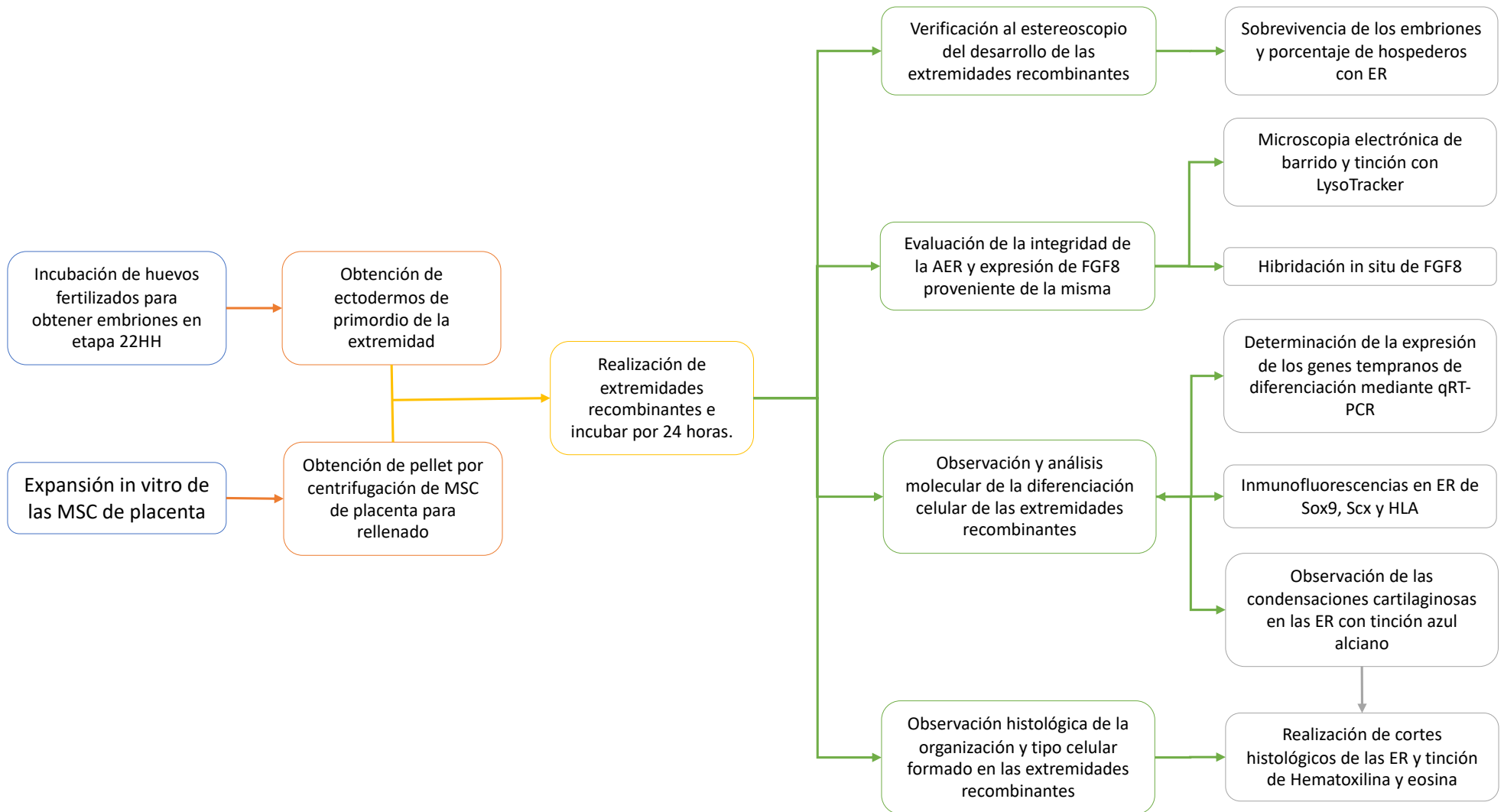
## **7. Objetivo general**

Evaluar el estado de compromiso y la capacidad morfogenética de las MSC placentarias después de recibir señales provenientes del ectodermo embrionario en un modelo *in vivo*.

## **8. Objetivos particulares**

- Analizar la capacidad de las MSC placentarias para formar extremidades recombinantes.
- Evaluar la integridad celular y molecular del ectodermo embrionario que conforma las extremidades recombinantes de MSC placentarias.
- Analizar el perfil de expresión temporal de genes tempranos de diferenciación hacia los linajes condrogénico, osteogénico y tenogénico en las extremidades recombinantes de MSC placentarias.
- Evaluar la organización histológica y el fenotipo desarrollado en las extremidades recombinantes de las MSC placentarias al recibir señales embrionarias provenientes del ectodermo.

## Diseño experimental



## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Extremidades recombinantes

La técnica consta de 4 pasos generales: 1) obtención de los ectodermos, 2) obtención del botón de células para rellenar los ectodermos, 3) rellenar los ectodermos con el botón y 4) implantación de los ectodermos rellenos en un embrión hospedero (Marín-Llera et al., 2022).

#### 9.1.1 Obtención de ectodermos

Se obtuvieron huevos fertilizados de gallina White Leghorn (ALPES, Puebla, México) y se clasificó su etapa de desarrollo según Hamburger y Hamilton (1951). 60 huevos fértiles de *Gallus gallus* se incubaron por tres días y medio en una incubadora *Incumatic 1000* a 38°C y 60% de humedad relativa con movimiento. Este número de huevos fue suficiente para la técnica completa de ER, por lo que se obtuvieron 20 ER-PL aproximadamente por sesión. Transcurrido ese tiempo, a los huevos se les hizo una pequeña ventana en el extremo romo para poder visualizar si el embrión logró desarrollarse y si se encontraba en la etapa adecuada. De los 60 huevos fértiles, alrededor de 52 huevos eran viables. Una vez seleccionados los embriones en etapa 22HH, alrededor de 23 embriones se escogieron para obtener los ectodermos. Se sacó al embrión del huevo con ayuda de unas pinzas curvas y se transfirieron a una caja Petri con PBS 1x (Phosphate Buffer Saline) para lavar la sangre. Una vez en la caja, con ayuda de unas pinzas con punta fina (Fine Science Tools, 9115-10) se cortaron los primordios de extremidades. Los primordios obtenidos se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml con ayuda de una pipeta de transferencia y se retiró la mayor cantidad de PBS. Se agregaron 500 µl de tripsina (Sigma, Cat. 85450C) al 0.5% y se incubaron en esta solución por 30 minutos a 37°C. Esta enzima separa la mesénquima del ectodermo. Una vez cumplido este tiempo, se transfirieron los primordios a una caja Petri estéril y se retiró la mayor cantidad posible de tripsina. Se agregó una solución de SFB (Suero Fetal Bovino) (ATCC, Cat. 30-2020) al 10% en PBS suficiente para cubrir por completo los primordios. Esta solución inactiva a la tripsina. Posteriormente, con ayuda de las pinzas se separó el ectodermo del mesénquima de cada uno de los primordios tratados. Al obtener los ectodermos se procuró que quedarán completamente limpios y libres de mesénquima antes de ser utilizados.



### 9.1.2 Obtención de células para rellenar ectodermos

Para rellenar los ectodermos, se utilizaron las MSC placentarias. Las MSC se obtuvieron por la colaboración con investigadores del Centro Médico Nacional Siglo XXI, de acuerdo con el protocolo reportado por (Fajardo-Orduña et al., 2017).

Una vez expandidas las células, se cosecharon con tripsina al 0.5% y se formó un botón celular centrifugando las células a 1300 rpm. El botón celular se incubó con 1 ml de medio DMEM-LG (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium-Low Glucose*) suplementado con SFB 10% durante 1.5 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células estuvieron listas para ser colocadas dentro de los ectodermos previamente obtenidos.

### 9.1.3 Rellenar ectodermos

Se retiraron aproximadamente 800 µl de medio del tubo en donde se formó el botón de MSC de placenta. Con una punta de micropipeta se despegó el botón del fondo del tubo y se transfirió por gravedad a la caja en donde se tenían los ectodermos en solución PBS-Suero 10%. Una vez hecho lo anterior, con ayuda de unas pinzas finas se cortó el pellet de un tamaño adecuado para colocarlo dentro de los ectodermos y se rellenaron consecutivamente los ectodermos. Finalizando el rellenado, se retiraron las células que no se utilizaron, se transfirieron junto con PBS-Suero a un tubo de microcentrifuga y se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos, pasado el tiempo de centrifugación se retiró todo el PBS del tubo. El botón formado se almacenó a -20°C con la finalidad de obtener RNA para los ensayos de PCR. Finalmente, se hizo un recambio del PBS-Suero de los ectodermos rellenados y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos antes de ser implantados.

### 9.1.4 Implantación de los ectodermos

Los ectodermos rellenos con MSC placentarias se implantaron en embriones de *Gallus gallus* en etapa 22HH. Para ello, se hizo una ventana al huevo, y con unas pinzas finas se retiró la membrana aérea y el amnios. Después, con una aguja de tungsteno (GoodFellow, E74-15096/01) se hizo una pequeña herida al embrión en el área de las somitas, al mismo nivel de las extremidades anteriores. Se tomó el ectodermo relleno con un cuchillo de hendidura en ángulo (Alcon, 2.75mm DB) y se acomodó sobre el sitio de la herida. Una vez en el sitio deseado, el ectodermo relleno se fijó al embrión con dos alambres de paladio (GoodFellow

Corporation, Cat. 522-738-52). Finalmente se selló el huevo con cinta adhesiva y se incubó sin movimiento por 24, 48 y 72 horas dependiendo del experimento a realizar a 38°C. En cada sesión se operaron alrededor de 29 embriones.

Posterior a la incubación, se revisó al microscopio estereoscópico que los embriones hayan sobrevivido a la operación las horas indicadas y que el implante haya logrado unirse al embrión y desarrollarse.

Todos los experimentos para este proyecto se realizaron por triplicado, por lo tanto, del total de extremidades recombinantes obtenidas de distintas sesiones de operación y según el porcentaje de sobrevivencia:

30 ER fueron utilizadas para tinción de esqueleto y cortes histológicos

120 ER fueron utilizadas para qRT-PCR

19 ER fueron utilizadas para muerte celular

23 ER fueron utilizadas para hibridación in situ

18 ER fueron utilizadas para inmunofluorescencia

## ***9.2 Tinción con azul alciano***

Una vez pasadas las 24, 48 o 72 horas post-operación (hpo), se evaluó el porcentaje de sobrevivencia y se seleccionaron los embriones en los cuales la ER-PL (Extremidades Recombinantes-Placenta) se logró unir satisfactoriamente. Los embriones se extrajeron del huevo con ayuda de unas pinzas curvas y se colocaron en una caja Petri con PBS 1x para lavar la sangre, se quitaron las vísceras y se conservó la parte del embrión que nos interesa, en este caso, fue el tronco ya que la ER-PL se encontraba injertada en las somitas. Los embriones con la ER-PL se transfirieron a un vial de vidrio con ayuda de unas pinzas curvas y el tejido se fijó en TCA al 5% (ácido tricloroacético) (Sigma-Aldrich, Cat. T6399) (ver anexo 13.2) a 4°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, para comenzar a teñir el tejido cartilaginoso los embriones se transfirieron a una solución del azul alciano al 1% diluido en alcohol ácido (Sigma-Aldrich, A5268) (ver anexo 13.2). Al día siguiente, se retiró el colorante con una pipeta de transferencia y los embriones se lavaron dos veces con alcohol ácido (Sigma-Aldrich, Cat. 335630) por 30 minutos para quitar el exceso de colorante. Después, se deshidrataron en etanol absoluto dos veces durante una hora cada lavado. Finalmente, los embriones se aclararon con metilsalicilato (Sigma-Aldrich, Cat. M2047) el

tiempo necesario hasta que las estructuras de cartílago fueran evidentes. Las muestras se fotografiaron en un microscopio estereoscópico AxioZoom V.16 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) utilizando el software Zen lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

### ***9.3 Inclusión en parafina y cortes histológicos***

Antes de comenzar con el procesamiento de las muestras, se precalentó la parafina en un dispensador de parafina hasta su punto de fusión de 70°C, al mismo tiempo se calentó la plancha de parafina para poder precalentar los casetes de inclusión y manipular la parafina a la misma temperatura. Para ayudarnos a manipular y orientar correctamente las muestras, fue necesario calentar pinzas de punta fina y una aguja.

A las ER-PL teñidas con azul alciano se les realizó dos lavados de 5 minutos cada uno con Xilol (J.T.Baker, Cat. 9490-02), y dos lavados de 1 hora cada uno con una solución xilol-parafina 1:1 (Sigma-Aldrich, Cat. P3558). En un casete para inclusión se vertió un poco de parafina y con pinzas calientes, se colocó el tejido con la ER-PL en el molde. Con ayuda de un microscopio estereoscópico y de la aguja, se observó la muestra y se orientó de la manera deseada. Una vez acomodada la muestra, se terminó de ensamblar el molde de inclusión, se colocó un poco de parafina y se dejó enfriar antes de llenar el molde totalmente. Una vez lleno el molde se dejó enfriar en hielo y posteriormente se guardaron las muestras a 4°C por 24 horas antes de poder ser cortadas.

Transcurrido el tiempo, se desmoldó la muestra ya incluida en parafina. Para cortar las muestras se utilizó un micrótomo Leica RM2125 RTS. Se colocó en el portamuestras del micrótomo y se orientó para poder realizar cortes longitudinales de la ER-PL.

Se obtuvieron cortes de 10 µm, y con ayuda de un pincel se recolectaron de manera seriada sobre una gota de agua destilada en diferentes portaobjetos. Al terminar, los cortes se mantuvieron en una plancha de estiramiento durante 24 horas a 42°C. Pasado el tiempo los cortes se colocaron en una cámara de vacío por otras 24 horas y finalmente se almacenaron a 4°C hasta su tinción con hematoxilina y eosina.

### ***9.4 Tinción con Hematoxilina y Eosina***

El azul alciano es un colorante para teñir cartílago debido a que este tiñe glicosaminoglicanos presentes en la ECM, el color azul se debe al cobre presente en el colorante. Estas

condensaciones se observan en un azul más oscuro en el centro del primordio de la extremidad.

Para poder realizar la tinción fue necesario utilizar xilol como solvente para eliminar la parafina. Posteriormente, se rehidrataron los cortes histológicos en un tren descendente de xilol-etanol (Dos veces Xilol, dos veces Etanol Absoluto, Etanol 96%, Etanol 70%, Etanol 50% y Agua Bidestilada) cada solución por 5 minutos. Para teñir los núcleos celulares se colocaron los portaobjetos con los cortes en Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) por 3 minutos y una vez transcurrido el tiempo, se removió el exceso de colorante con agua bidestilada. Después se sumergieron en alcohol ácido al 1% hasta virar a azul. Enseguida, para teñir los componentes de MEC se realizó una segunda tinción con eosina (Sigma-Aldrich, Cat. HT110) durante 3 minutos y se removió el exceso de colorante con un lavado de agua corriente.

Finalmente, para poder montar los cortes y evitar burbujas de agua en las muestras, los cortes se deshidrataron en un tren ascendente de etanol-xilol (Etanol 90%, dos veces Etanol Absoluto, dos veces Xilol) cada solución por 5 minutos. Las muestras se montaron con un cubreobjetos en medio Cytoseal 60 (Thermo Scientific, Cat. 8310-4). Las fotografías se obtuvieron en campo claro en un microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) localizado en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, sede Tercer Circuito Exterior.

### ***9.5 Microscopía electrónica de barrido***

Una vez obtenidos los embriones con la ER-PL a las 24 hpo, se lavaron en PBS y se removieron las vísceras, después se hicieron tres con PBS 1X durante 10 minutos a 4°C cada uno. Luego, los embriones se incubaron en una solución de glutaraldehído al 2.5% durante 2 horas y posteriormente, para poder fijar las muestras y minimizar los cambios conformacionales de las proteínas se hicieron tres lavados con la solución de buffer de cacodilato 0.1M (ver anexo 13.3) de 10 minutos a 4°C.

Después, para osmicar el tejido se colocó en una solución de tetraóxido de osmio al 1% (ver anexo 13.3) durante 2 horas y crear un contraste para la imagen. Se volvieron a hacer tres lavados con solución lavadora de buffer de cacodilato 0.1M (ver anexo 13.3) durante 10

minutos cada uno a 4°C y posteriormente la muestra se almacenaron en una solución de buffer de lavado (ver anexo 14.2) a 4°C.

Las muestras se deshidrataron en un tren ascendente de etanol (30%, 50%, 70% 80%, 90%, 100%) durante 15 minutos cada uno. Finalmente, las muestras se desecaron en una cámara de secado de CO<sub>2</sub>, y se montaron en rejillas especiales para poder tomar las fotografías.

### **9.6 Hibridación *in situ* para *Fgf-8***

Una vez que se obtuvieron los embriones con la ER-PL a las 24 hpo, se lavaron en PBS 1x y se removieron las vísceras. Las muestras se colocaron en un vial de vidrio y se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA al 4%) (Sigma-Aldrich, Cat. P6148) (ver anexo 13.4) durante toda la noche. Al día siguiente se deshidrataron en un tren ascendente de metanol-PBT (ver anexo 13.4) (PBS, PBT, metanol 25%, metanol 50%, metanol 75%, metanol absoluto) y se guardaron a -20°C hasta procesar. Para iniciar la hibridación *in situ*, fue necesario volver a hidratar y se utilizó un tren ascendente de los mismos porcentajes de metanol hasta PBT. Posteriormente, las muestras se trataron con peróxido de hidrogeno al 6% en PBT durante 1 hora para aclarar y permeabilizar los tejidos. Después, se retiró el peróxido con ayuda de una pipeta de transferencia, se hacen 3 lavados en PBT durante 5 minutos cada lavado a temperatura ambiente y se añadió proteinasa K a una concentración de 15 µg/ml durante 20 min a 20°C para *Fgf-8* procurando que la temperatura se mantuviera estable mediante baño húmedo. Se cambiaron las muestras a una solución de PFA al 4% con glutaraldehído al 0.2% a 4°C durante 20 minutos, pasado el tiempo se retiró el exceso de la solución y se hicieron dos lavados con PBT por 5 minutos cada uno. Posteriormente, las muestras se cambiaron al buffer de hibridación pre-calentado y se mantuvieron en la solución durante 3 horas a 65°C. Después de este paso, fue necesario calcular cuanta sonda sería diluida suficiente para cubrir la muestra a partir de la sonda concentrada (1 µg/ml, diluyendo 1 µl en 100 µl de buffer de hibridación). Posteriormente, se desnaturalizó la sonda a 80-85°C por 2 minutos y transcurrido el tiempo se colocó inmediatamente en hielo. Se sustituyó el buffer de hibridación de las muestras por la sonda en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se incubó toda la noche a 65°C. La hibridación de las muestras se realizó utilizando sondas diseñadas específicamente para *Fgf-8* marcadas con digoxigenina. Al día siguiente se recuperó la sonda y se almacenó a -20°C. Las muestras se transfirieron a un vial de vidrio con la solución I

precalentada a 68°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora. Se repitió este paso y se precalentó la solución III a 68°C. Después, se reemplazó la solución I por una mezcla 1:1 de solución I-III y se mantuvo a 68°C durante 10 minutos. A continuación, se cambiaron las muestras a la solución III a 68°C durante 30 minutos y se realizó un cambio de la misma solución durante el mismo tiempo. Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados en 2 mM levamisol en TBST (tris-buffered saline (TBS) and Tween). Después, se bloqueó con una solución de suero de chivo al 10% en TBST + levamisol durante dos horas a 4°C y posteriormente, se realizó un bloqueo para el anti-DIG-AP con suero de chivo al 10% y se utilizó el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:2000. Para comenzar a revelar las muestras se realizaron dos lavados con una solución de NTMT (NaCl, Tris-Cl, MgCl<sub>2</sub>, Tween-20) + 1 mM levamisol durante 15 minutos cada lavado en agitación a temperatura ambiente. Después, se retiró el exceso de NTMT y el revelado se realizó mediante tinción con BM Purple AP (Roche, Cat. 11442074001), el tiempo de revelado fue de tres días. Para detener la reacción se realizaron dos lavados de 15 minutos cada uno en NTMT + 1 mM levamisol a temperatura ambiente. Después se hicieron dos lavados rápidos en PBS y finalmente, las muestras se preservaron con paraformaldehído al 2% en PBS a 4°C. Para tomar las fotografías se utilizó la misma solución en la que estén fijadas. Las fotografías se obtuvieron con un microscopio estereoscópico AxioZoom V.16 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) utilizando el software Zen lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

### ***9.7 Tinción de muerte celular con LysoTracker***

Para observar la muerte celular en las muestras a las 24 hpo, se lavaron los embriones con PBS y se removieron las vísceras para conservar la zona de los embriones que tienen unida la ER-PL. Se incubaron en una solución de LysoTracker (Invitrogen, Cat. L7528) (ver anexo 13.5) durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo, se hicieron lavados con PBS para remover la mayor cantidad de LysoTracker y los embriones se fijaron en PFA al 4% toda la noche a 4°C. Al siguiente día se deshidrataron en un tren ascendente de metanol-PBT (metanol 25%, metanol 50% metanol 75%, metanol absoluto). Por último, para poder transparentar el tejido se colocó en una solución 50% de metanol absoluto-bencil benzoato con bencil benzol, y finalmente se pasó a otra solución de bencil benzoato con bencil benzol.

Se mantuvieron en esta última solución hasta fotografiar. Para obtener las fotografías en fluorescencia, se utilizó un microscopio vertical Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) (Olympus Corporation) utilizando el programa Stereo Investigator v.9 (MicroBrightField Inc., Colchester, VT, Estados Unidos) localizado en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, sede Tercer Circuito Exterior.

### ***9.8 Obtención de RNA, retrotranscripción y PCR cuantitativa (qRT-PCR)***

En esta sección de la metodología solo se utilizaron las ER-PL al tiempo de 24 hpo para obtener el RNA, por lo que una vez que el embrión se colocó en la caja Petri, con ayuda de pinzas finas se cortaron las ER-PL y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Una vez que se recolectaron las muestras, se centrifugaron a 1300 rpm durante 3 minutos, se retiró el exceso de PBS y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Fue necesario recolectar 35 ER-PL para cada repetición. De la misma manera, también se congeló el pellet de las MSC de placenta para obtener el RNA como la expresión basal para evaluar la expresión de los genes *Sox9*, *Agrecano*, *Col2a1*, *Runx2*, *Gdf5*, *Scx*, *Mhx* y *MHC* en las ER-PL.

La obtención del RNA se realizó con el kit NucleoSpin RNA (Machery-Nagel, Cat. 740955) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo consiste en la unión de los ácidos nucleicos a una membrana de sílica, para posteriormente hacer una digestión del DNA genómico mediante desoxirribonucleasas. Se realizaron lavados a la membrana con buffers que removieron sales y metabolitos. Finalmente, el RNA obtenido en la columna se eluyó en condiciones de baja fuerza iónica con  $20\mu\text{L}$  agua libre de RNAsas. Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific) y se verificó la integridad mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA 16500).

La retrotranscripción para la síntesis de cDNA se realizó a partir de  $1\mu\text{g}$  de RNA con la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega, Cat. M170A),  $1\mu\text{L}$  de RNAsa out,  $1\mu\text{L}$  de Oligo dT,  $1\mu\text{L}$  DNTP mix,  $2.5\mu\text{L}$  Buffer y se llevó a un volumen final  $12.5\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  de ser necesario. Se utilizó un termociclador PT-100 (MJ Research) y se programó para las siguientes temperaturas de reacción:

$25^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos

$42^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos

72°C durante 10 minutos

4°C durante 5 minutos

Posteriormente, el cDNA se cuantificó en un NanoDrop One (Thermo Scientific) y se llevó a una concentración de 0.5 µg/µL con agua estéril libre de nucleasas.

A partir del cDNA generado, se realizó la PCR cuantitativa para los genes *Sox9*, *Col2a1*, *Hif1α*, *Aggrecan*, *Gdf5*, *Scx*, *Mhx*, *Runx2*, *MHC*. Como gen control (housekeeping) se utilizó el gen *EF1-α* (ver secuencias en anexo 13.6). La reacción de PCR se preparó con 10 µL de SYBR Green (ThermoFisher, Cat. 439155), 9 µL (10 µM) de primers para los respectivos genes, y 1 µL (0.5 µg/µL) del cDNA de las muestras. La PCR se realizó en un termociclador RotorGene-Q 5PLEX. Las curvas y los ct (tiempo de amplificación) obtenidos se analizaron según un threshold establecido. Posteriormente, se calculó el  $\Delta Ct = Ct \text{ gen X} - Ct \text{ gen housekeeping}$ . Después se calculó el  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ housekeeping} - \Delta Ct \text{ ER}$  y finalmente se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para calcular la sobreexpresión de los genes seleccionados en la muestra de las ER-PL en comparación con la muestra housekeeping.

Posteriormente, se calculó el promedio de las tres repeticiones de PCR y se crearon las gráficas para la interpretación de los datos. Para hacer las gráficas se utilizó el programa Prism 9 (GraphPad) y se realizó un T-test paired. Se tabularon los promedios obtenidos de sobreexpresión de cada gen, se calculó la desviación estándar y para tomar la sobreexpresión como significativa se tomó en base al valor  $P < 0.05$ . Si el P valor obtenido de los tres promedios era menor a 0.05, la sobreexpresión era significativa.

### **9.9 Inmunofluorescencia para Sox9, Scx y HLA**

Los embriones con ER-PL a las 24 horas hpo se lavaron en PBS, se removieron las vísceras y se conservó el tejido que tenían unido la ER-PL, se fijaron en PFA 4% y se dejó toda la noche a 4°C. Después, se deshidrataron en un tren ascendente de Etanol-PBT (PBT, Etanol 25%, Etanol 50%, Etanol 75%, Etanol absoluto) y se guardaron a -20°C hasta incluir. La inclusión de las muestras se realizó en parafina con el mismo protocolo descrito previamente. Para la inmunotinción las laminillas se desparafinaron con dos lavados de xilol por 5 minutos cada uno. Se rehidrataron en un tren ascendente de etanol-PBT (Etanol absoluto, etanol 75%, etanol 50%, etanol 25%, PBT 100%, PBS). Después, con ayuda de una pipeta de transferencia se les colocó a las laminillas  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  (J.T.Baker, Cat. M-31442) 1 mM en



NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> (J.T.Baker, Cat. 0596-01) 50 mM pH=5 (ver anexo 13.5) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con H<sub>2</sub>O destilada por 5 minutos y luego otro con tritón 0.3% (ver anexo 13.5) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para la recuperación de epitopes se les colocó Immunoretriever (BIOSP, Cat. BIO0020) con ayuda de una pipeta de transferencia y se cubrió con Parafilm. Las laminillas se incubaron a 65°C por 45 minutos en plancha y se dejaron enfriar por tres minutos. Después, se realizaron 2 lavados con PBS cada uno por 5 minutos para posteriormente realizar un bloqueo con SFB al 5% en PBS por 2 horas. Después se incubaron las laminillas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS;  $\alpha$ -Sox9 (Millipore, Cat. AB5535),  $\alpha$ -Scx (Abcam, Cat. Ab58655) o  $\alpha$ -HLA ratón (Abcam, Cat. Ab70328) (Ver anexos 13.7), y se cubrió con Parafilm toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se realizaron dos lavados con PBS por 5 minutos cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS (Ver anexos 13.7);  $\alpha$ -rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch, Cat.11-165-144) o  $\alpha$ -ratón Alexa 555, y se cubrió con Parafilm (ver anexo 13.7) a temperatura ambiente durante dos horas. Después, se hicieron 3 lavados con PBS por 5 minutos y se incubaron con DAPI 1:500 en PBS durante 5 minutos. Finalmente, se realizó un lavado de PBS y uno con agua destilada de 5 minutos cada uno y se montaron las laminillas con SlowFade TM (Invitrogen, Cat. S36963). Las fotografías se obtuvieron en un microscopio vertical Olympus BX51-WI, acoplado con una unidad de disco giratorio (Olympus Corporation) utilizando el programa Stereo Investigator v.9 (MicroBrightField Inc., Colchester, VT, Estados Unidos).

## 10. Resultados

Como primer punto de este estudio fue necesario evaluar la sobrevivencia de las ER-PL implantadas en los embriones transcurridas 24, 48 o 72 hpo y revisar al microscopio estereoscópico que la ER-PL estuviera correctamente unida. Los resultados mostraron que del total de los 17 lotes de embriones operados para el proyecto (aproximadamente 29 embriones operados por lote), un 62.95% de los embriones lograron tener el injerto bien unido y desarrollar una ER. Se observó además que las ER implantadas correctamente en el embrión hospedero tuvieron un tamaño alrededor de 100  $\mu$ m. Las ER-PL obtenidas fueron divididas para evaluar los distintos objetivos del proyecto.

### ***10.1 Evaluación del compromiso de las MSC placentarias hacia los linajes mesodérmicos presentes en la extremidad embrionaria***

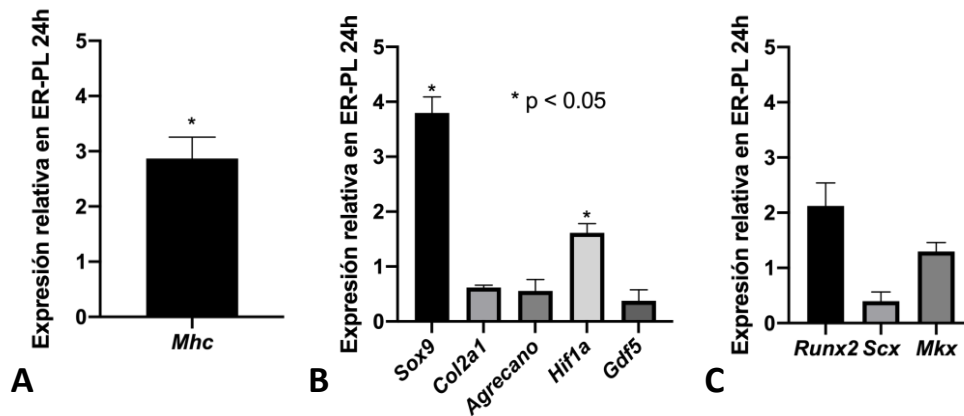
Para determinar el estado de compromiso de las ER-PL a tiempos cortos, se evaluó la expresión de genes tempranos de diferenciación hacia los linajes presentes en la extremidad embrionaria en las ER-PL a las 24 hpo. Los genes evaluados fueron *Sox9*, *Col2a1*, *Hif1 $\alpha$* , *Acan* y *Gdf5* para el linaje condrogénico, *Runx2* para el linaje osteogénico, *Scx* y *Mkx* para el linaje tenogénico y, *Mhc-1* para evaluar la presencia de células humanas. Los niveles de expresión génica en las ER-PL se compararon con los niveles de expresión basal del botón de MSC placentarias, es decir, antes de recibir las señales inductoras.

Se observó que la expresión de *Mhc-1* aumentó significativamente en las ER-PL ( $2.50\pm 0.24$ ;  $p<0.01$ ) en comparación con la expresión basal de las células del botón, lo cual confirma la presencia de células humanas en las recombinantes formadas (Fig. 14A).

Respecto a la expresión de genes asociados al linaje condrogénico, se observó que *Sox9* aumentó significativamente su expresión en las ER-PL respecto a las células del botón ( $3.80\pm 0.50$ ;  $p<0.01$ ) (Fig. 14B). Por otro lado, la expresión de *Hif1 $\alpha$*  ( $1.62\pm 0.40$ ;  $p<0.12$ ) aunque con tendencia a aumentar no cambió significativamente respecto a los niveles observados en la expresión basal, mientras que la expresión de *Gdf5* ( $0.40\pm 0.35$ ;  $p<0.09$ ) asociado a la adhesión celular, *Col2a1* ( $0.62\pm 0.06$ ;  $p<0.1$ ) y *Acan* ( $0.50\pm 0.30$ ;  $p<0.3$ ) disminuyó. Esto sugiere un estado temprano de compromiso de las MSC hacia el linaje condrogénico después de 24 horas de haber formado una extremidad recombinante.

A diferencia del gen maestro asociado a la condrogénesis, los genes tempranos asociados a la tenogénesis mostraron una disminución de su expresión. Se observó una tendencia a la baja de la expresión de *Scx* ( $0.62\pm 0.5$ ;  $p<0.2$ ), mientras que *Mkx* ( $1.3\pm 0.3$ ;  $p<0.2$ ) aumentó, aunque en ambos casos no significativamente respecto a los niveles observados en el botón celular (Fig. 14C). Estos resultados sugieren un compromiso temprano de las MSC inducido por la expresión de *Mkx*.

Por otro lado, el gen maestro de la osteogénesis, *Runx2* mostró una tendencia a aumentar su expresión ( $2.10 \pm 0.70$ ;  $p < 0.1$ ). A pesar de que *Runx2* no tuvo un cambio significativo respecto a los niveles encontrados en la expresión basal, el aumento en su expresión sugiere el compromiso de las MSC hacia el linaje osteogénico (Fig. 12C).



**Figura 14.** Análisis de la expresión de genes tempranos de diferenciación hacia los linajes condrogénico, tenogénico y osteogénico en el sistema de ER-PL. A. Evaluación de Mhc-1 para evaluar la presencia de células humanas B. Evaluación de la expresión génica de los genes condrogénicos. C. Comparación de la expresión génica de los genes tenogénicos y osteogénicos. \*  $p < 0.05$  indicando un aumento significativo en la sobreexpresión del gen.

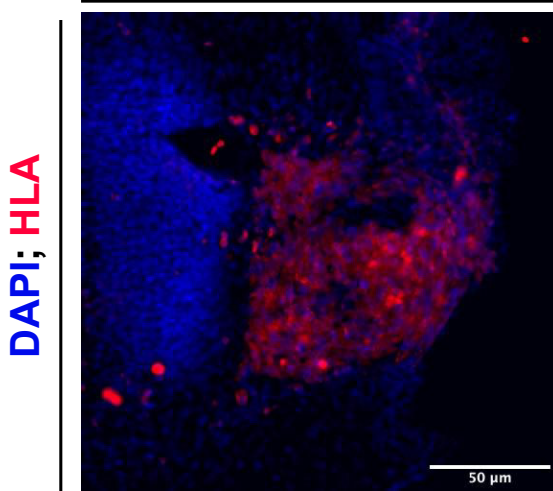
## 10.2 Determinación del patrón de expresión de SOX9 y SCX en las extremidades recombinantes de placenta

Una vez evaluado el estado de compromiso de las MSC de placenta hacia los linajes presentes en la extremidad, se determinó en que zona de la ER-PL las células estaban iniciando el proceso de diferenciación, mediante la evaluación del patrón de expresión de los genes SOX9 y SCX. Así mismo, se evaluó la presencia de células humanas en las ER-PL mediante una inmunotinción contra HLA.

En las extremidades recombinantes evaluadas para HLA, se observó un patrón homogéneo alrededor de los núcleos de las MSC dentro de la ER-PL (Fig.15). Este patrón de expresión de la proteína coincide con los niveles de expresión génica en los trabajos de qRT-PCR.

Por otro lado, SOX9 se observó en tres diferentes zonas de la ER-PL: en células de la zona proximal, en el centro y en las algunas células del ectodermo (Fig.16).

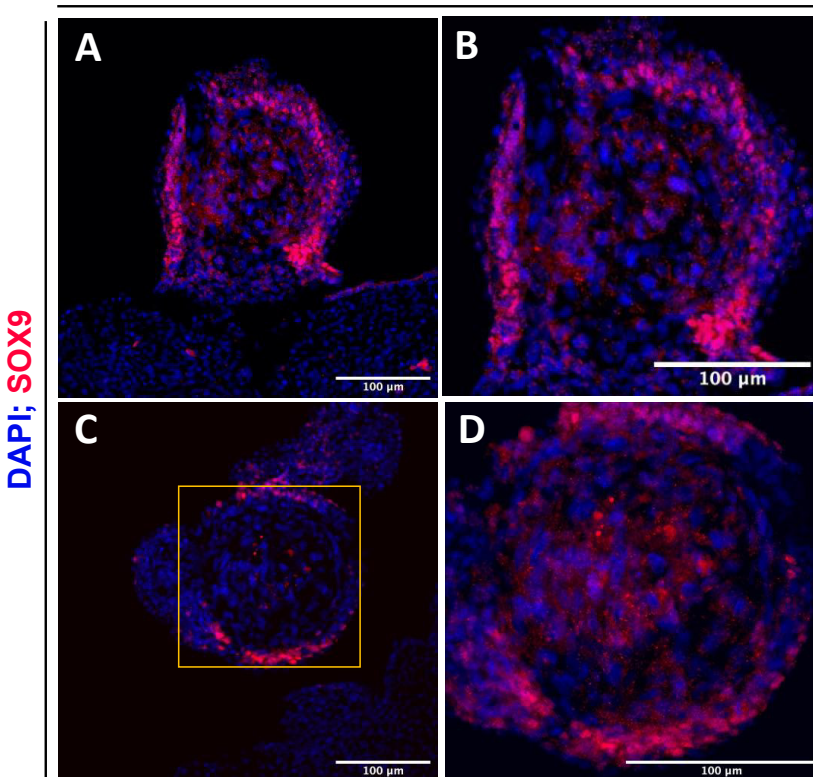
ER-PL 24 horas;  
Inmunofluorescencia



**Figura 15. Inmunofluorescencia de HLA en ER-Placenta.** Se observó una expresión transmembranaral en color rojo de HLA en las células en el centro de la extremidad recombinante (2/2). En azul se observa DAPI marcando los núcleos de las células.

Estos datos sugieren que las células localizadas en estas zonas de la ER-PL son las primeras en comprometerse hacia el linaje condrogénico. De manera importante, la marca de SOX9 se observó de manera nuclear confirmando la presencia de esta proteína como factor de transcripción, y el compromiso celular hacia el linaje condrogénico.

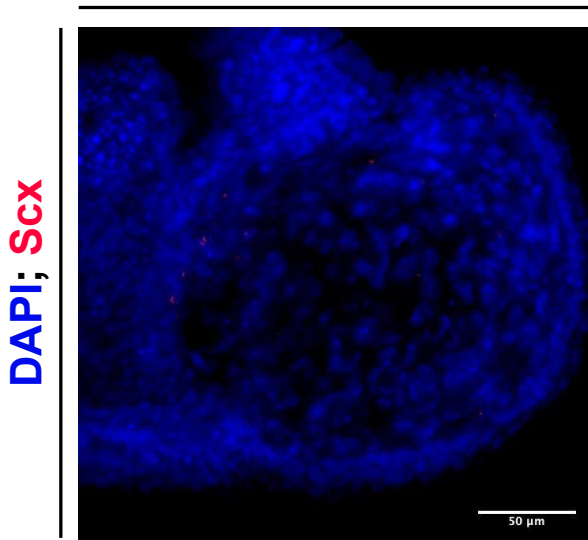
ER-PL 24 horas; Inmunofluorescencia



**Figura 16. Inmunofluorescencia de SOX9 en ER-Placenta.** A-C. ER-PL a las 24 hpo muestra un patrón de SOX9 en la mayoría de las células en el centro y en la periferia. B. Aumento de la imagen mostrada en A. D. Aumento de la imagen mostrada en C. (3/3) En azul se observa DAPI marcando los núcleos de las células.

La evaluación del patrón de expresión de SCX mostró que, en concordancia con el análisis hecho de qRT-PCR, la presencia de la proteína SCX en las ER-PL no se detectó en ninguna de las muestras evaluadas (Fig.17). Estos resultados sugieren que las MSC de placenta no adquieren un compromiso hacia el linaje tenogénico a las 24 hpo.

### ER-PL 24 horas; Inmunofluorescencia



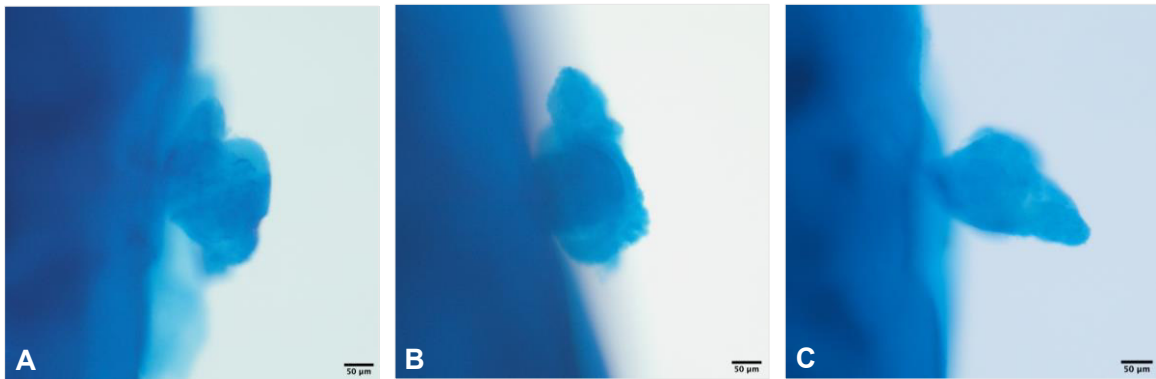
*Figura 17. Inmunofluorescencia de SCX en ER-Placenta. ER-PL a 24 hpo no presenta marcaje en rojo para las proteínas nucleares de Scx (2/2). En azul se observa DAPI marcando los núcleos de las células.*

### ***10.3 Evaluación del fenotipo asociado a condrogénesis de las extremidades recombinantes y la organización celular***

Una vez determinado que a partir de las 24 hpo las MSC de placenta se comprometen hacia el linaje condrogénico, se decidió evaluar a tiempos más largos el fenotipo asociado al proceso de diferenciación condrogénica en las ER-PL mediante la tinción con azul alciano a las 24, 48 y 72 hpo y 6 días post operación (dpo).

A las 24 hpo, los fenotipos que se obtuvieron fueron variados, desde morfologías circulares hasta más alargadas en el eje próximo-distal (Fig. 18). No obstante, en ninguna de las muestras evaluadas a las 24 hpo se observó una tinción con azul alciano que evidenciara de manera macroscópica una condensación celular (Fig. 18).

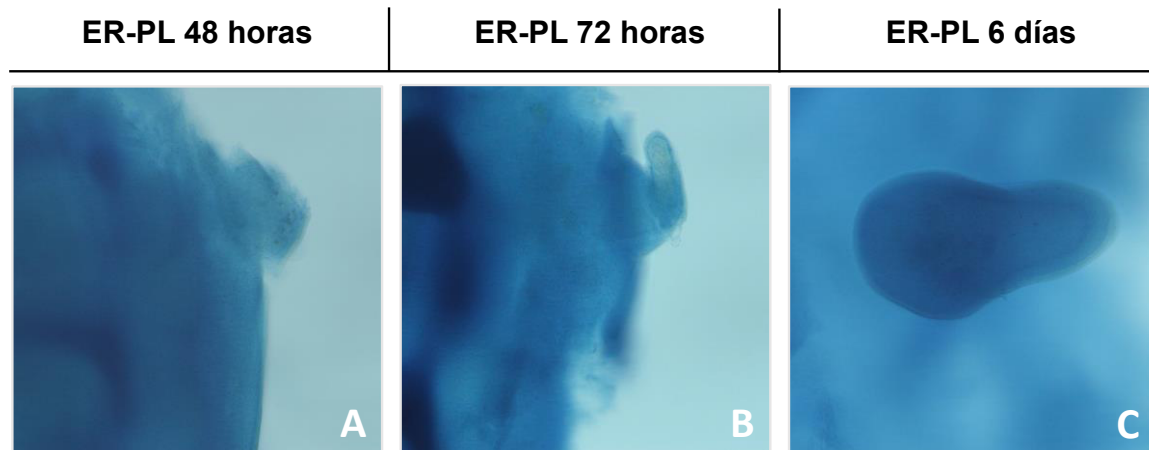
## ER-PL 24 horas; Azul alciano



**Figura 18. Fenotipo en azul alciano de ER-Placenta a las 24 horas post-operación.** Se muestran tres muestras distintas de ER-PL. **A.** Se observa una morfología circular con crecimiento en zonas anteriores y posteriores. **B.** Muestra una forma circular con un crecimiento en la zona anterior, se delimita mejor el ectodermo que recubre la recombinante. **C.** Muestra una morfología más alargada, con un crecimiento más notorio en el eje próximo-distal (15/15).

Por otro lado, a las 48 hpo se observó un tamaño similar de las ER-PL en comparación con las ER-PL de 24 hpo, observándose una morfología redondeada, no obstante, tampoco se distinguen condensaciones evidentes (Fig.19A). Sin embargo, a las 72 hpo se observó un crecimiento evidente de la ER-PL en el eje próximo-distal, y se observó una extensión en la zona distal de la estructura, haciéndose evidentes condensaciones celulares. A los 6 dpo el crecimiento próximo-distal de la ER-PL fue más pronunciado, se observó una morfología irregular y robusta que pareciese estarse alargando. Además, a este tiempo de evaluación se observó una condensación de las MSC placentarias justo en el centro de la ER-PL, similar las condensaciones dentro del primordio de la extremidad.

Para obtener más información de la organización de las células dentro de este sistema experimental, se realizaron cortes histológicos y una tinción de hematoxilina-eosina. Al observar la muestra al microscopio se observó un agrupamiento de MSC placentarias en el centro de la ER-PL, y una absorción de hematoxilina mucho más intensa en las MSC placentarias en comparación con las células del embrión hospedero (Fig. 20). Es importante resaltar que, las MSC placentarias son células de un diámetro pequeño, por lo que en el momento de rellenar se puede introducir un número considerable de células dentro de los ectodermos.



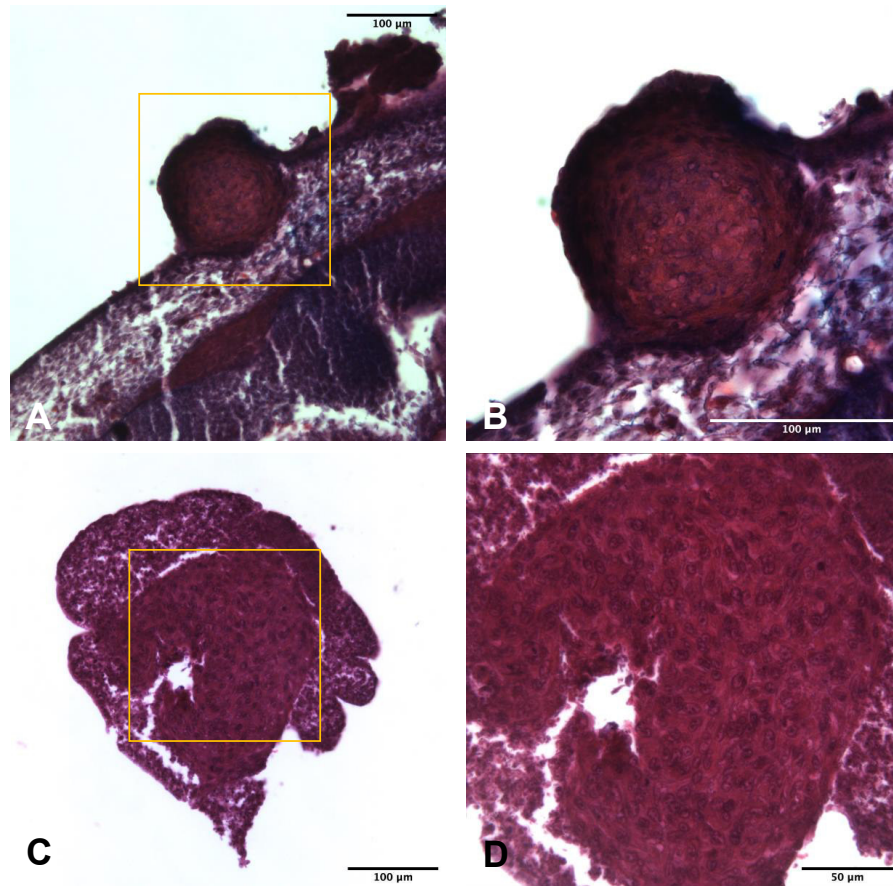
**Figura 19. Fenotipo en azul alciano de ER-Placenta a diferentes tiempos (48, 72 y días post-operación).** *A.* A las 48 hpo se logra observar un fenotipo similar que las 24 horas, no hay una diferencia de tamaño significativa. *B.* A las 72 hpo, comienza a aumentar el tamaño hacia el eje próximo-distal. *C.* A los 6 días ya se puede distinguir un fenotipo más grande y alargado en el eje PD. Además, ya se puede distinguir una condensación de células en el centro de la ER.

A las 24 hpo, se observó una ECM teñida de un color rosa/morado en las células que conforman la ER-PL; esta organización se identificó como un tipo de tejido conjuntivo irregular (Fig. 20). Además, a las 24 hpo se logró identificar zonas en la ER-PL que presentaban un contraste evidente entre la tinción de hematoxilina-eosina y el azul alciano, esto evidenció el proceso condrogénico de las MSC. Estos resultados sugieren que el estado de compromiso celular hacia el linaje condrogénico es muy temprano en las MSC placentarias después de permitir su diferenciación dentro de la ER durante 24 hpo.

Al analizar las ER-PL a las 48 hpo, se observó una condensación de células evidente y su organización como un tejido conjuntivo irregular, así como un incremento del tamaño de las MSC placentarias (Fig.21A-B). También, el ectodermo presentó un engrosamiento en la zona distal de la ER-PL.

A las 72 hpo se observó una organización similar de las MSC placentarias que a las 48 hpo, pero con una mayor tinción con azul alciano del tejido (Fig.21C-D). Estos fenotipos sugieren que, en este sistema, las MSC pueden continuar su desarrollo durante periodos de tiempo más largos y de continuar su diferenciación hacia linaje condrogénico.

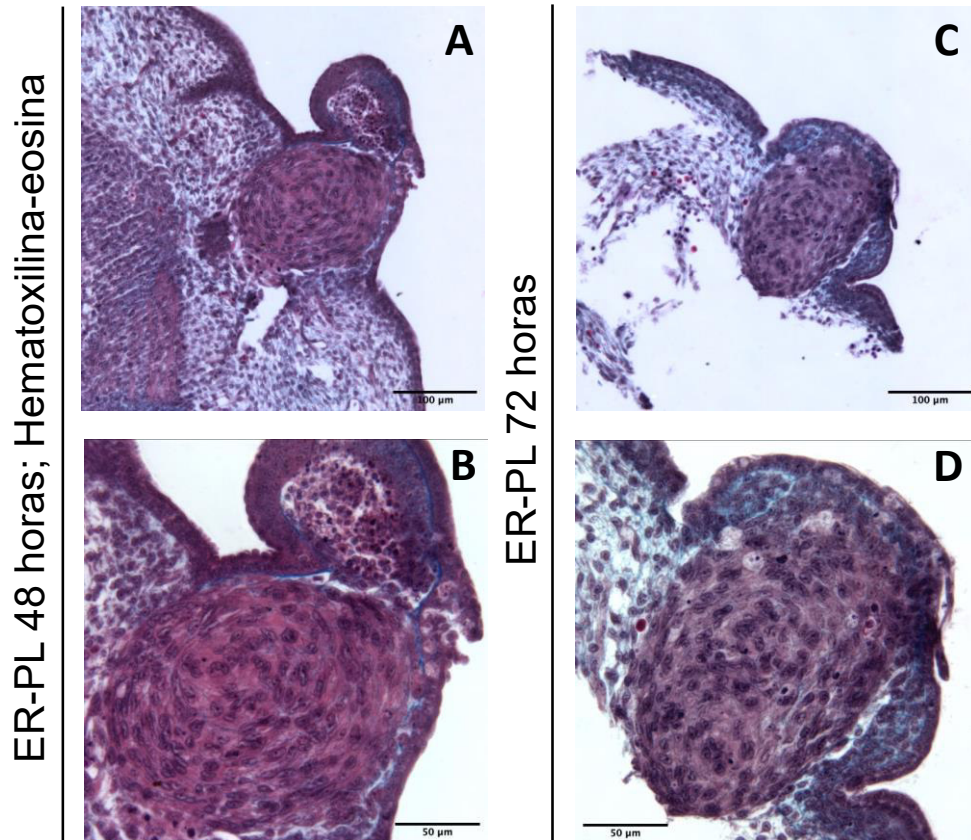
**ER-PL 24 horas; Hematoxilina-eosina**



**Figura 20. Organización celular de la ER-Placenta a las 24 horas post-operación.** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. **A.** ER-PL unida al embrión hospedero se observa un epitelio simple y MSC placentarias conglomeradas rodeadas de una MEC. **B.** Aumento de la figura A. **C.** ER-PL sin tejido del hospedero, se observa un epitelio simple alrededor de las MSC placentarias, estas células también se observan rodeadas de una MEC, además de una migración de células del hospedero, es este caso células de pollo. **D.** Aumento de la figura C. (6/6).

Al mismo tiempo, las histologías permitieron evaluar el mantenimiento de la AER en las ER-PL. En los cortes se observó un epitelio simple de una sola capa de células escamosas/planas (Fig. 20), sugiriendo que este epitelio podría estar dirigiendo el crecimiento de la ER-PL.



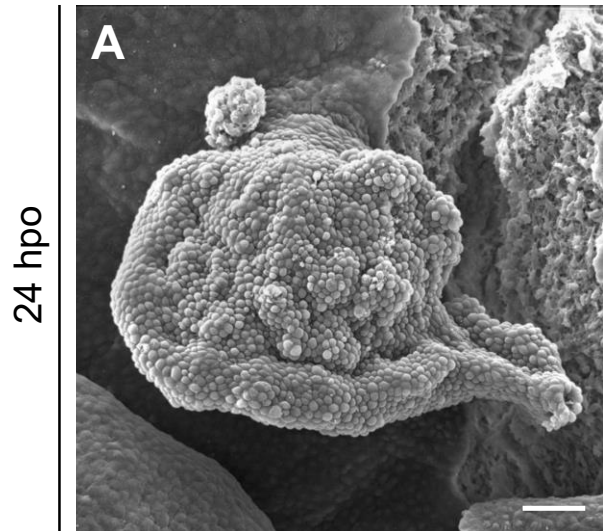


**Figura 21. Organización celular de las ER-Placenta a las 48 y 72 horas post-operación.** *A.* A las 48 hpo es evidente la condensación de las MSC, también, comienza a ser notorio el contraste con la tinción de azul alciano en los alrededores de las condensaciones y un epitelio con un engrosamiento en zonas distales. *B.* Aumento de la figura A. *C.* A las 72 hpo se ve un aumento de tamaño de ER-PL, la tinción con azul alciano es más evidente alrededor de las MSC condensadas en el centro de la recombinante, en esta muestra el epitelio se vuelve simple, como en las muestras evaluadas a las 24 horas. *D.* Aumento de la figura C.

#### **10.4 Evaluación del mantenimiento de la AER y las señales inductivas que emite**

Dentro del sistema experimental de ER se somete a las MSC de placenta a las señales embrionarias del ectodermo, por lo que fue importante evaluar en las ER-PL la integridad del ectodermo y la presencia de la AER y de las señales que esta emite. La evaluación de las ER-PL a las 24 hpo mediante MEB demostró que se logra mantener un epitelio engrosado muy similar a la AER a lo largo del eje AP de la ER (Fig. 22).

## MEB; ER-PL



**Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de ER-Placenta a las 24 horas post-operación. A. ER-PL a las 24 hpo que presenta un engrosamiento del ectodermo en la zona distal de la muestra que va a lo largo del eje antero-posterior (2/2). Escala de barra: 50  $\mu$ m.**

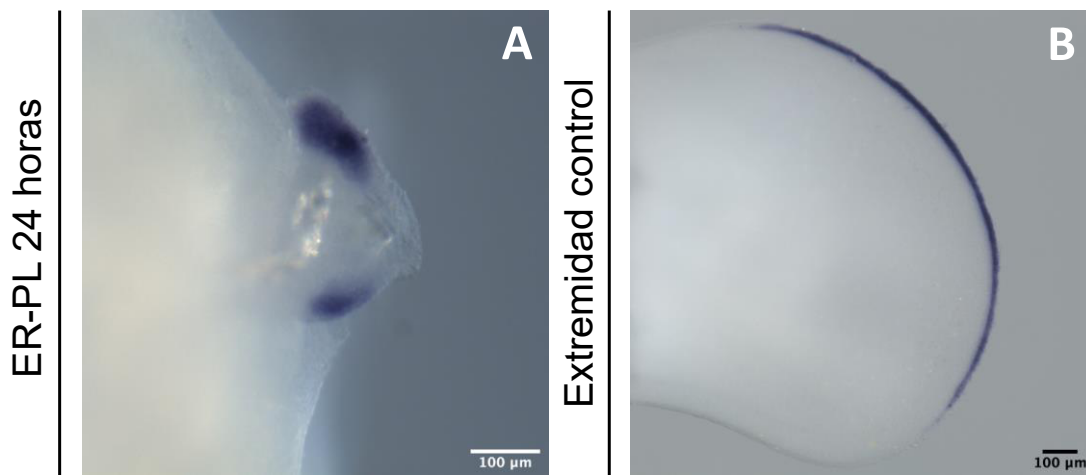
Además, se confirmó que la ER-PL estaba injertada correctamente al embrión. Estos resultados sugieren al menos a las 24 hpo la AER se mantiene y, por ende, se esperaría que también se mantuviera la expresión de *Fgf-8* en el ectodermo.

### **10.5 Evaluación de la expresión de *fgf-8* en el ectodermo de las extremidades recombinantes**

Una vez evaluado que a las 24 hpo la AER se mantenía en las ER-PL, la siguiente pregunta fue si las señales provenientes de este centro señalizador se continúan generando. *Fgf-8* es esencial para mantener a las células en un estado indiferenciado y proliferativo, por lo que se analizó su presencia y su patrón de expresión dentro de la ER-PL mediante una *hibridación in situ*. Los resultados mostraron que la expresión de *Fgf-8* estuvo presente de forma discontinua en zonas anteriores y posteriores del ectodermo (Fig. 23A), mientras que en otras muestras no se observó.

Que el patrón de *Fgf-8* en la ER-PL fuera discontinuo sugiere que no todas las MSC mantienen el loop de retroalimentación con el ectodermo, lo que permite sugerir que se trate de una población heterogénea.

## Hibridación in situ FGF8

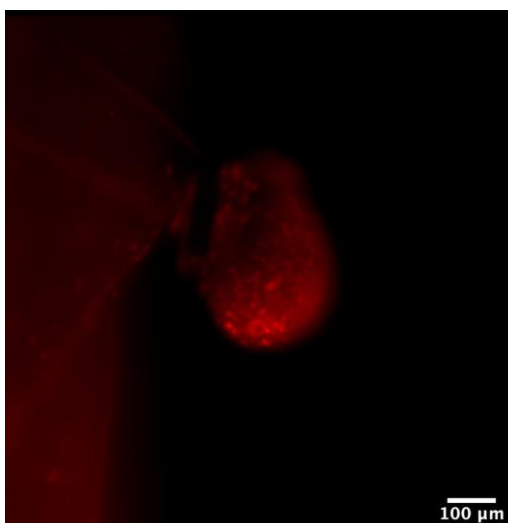


**Figura 23. Hibridación in situ para *Fgf-8* en la ER-Placenta.** A. ER que mantiene la expresión del gen de *Fgf-8*. Se observa un patrón donde *Fgf-8* se expresa en zonas anteriores y posteriores de la muestra (6/9). B. Extremidad control positiva a la expresión de *Fgf-8* en la AER.

### 10.6 La muerte celular es un proceso dependiente de la expresión de *Fgf-8*

Una vez determinado que la expresión de *Fgf-8* en las ER-PL de 24 hpo es discontinua, se evaluó si la falta de *Fgf-8* podría estar llevando a las células a un proceso de muerte celular. En todas las muestras evaluadas se observó la presencia de puntos rojos en zonas distales de las ER-PL, justamente en el ectodermo que recubre a las MSC placentarias (Fig.24). Esto nos sugiere que la muerte celular en algunas zonas del ectodermo podría coincidir con la ausencia de la señalización de *Fgf-8* en las ER-PL.

#### ER-PL 24 horas; LysoTracker



**Figura 24. Presencia de muerte celular en la ER-PL 24 horas post-operación.** ER-PL evaluada a las 24 hpo en la cual se observa el comienzo de muerte celular por la tinción fluorescente en las células posicionadas distalmente (6/6).

## 11. Discusión

En este proyecto, se evaluó la capacidad de las células mesenquimales estromales obtenidas de placenta para diferenciarse hacia los linajes condrogénico, tenogénico y osteogénico, así como su capacidad de organizarse en el tiempo y el espacio en un sistema *in vivo* bajo la influencia de señales que se reciben durante el desarrollo embrionario.

El proceso de diferenciación comienza con el compromiso de las células de manera concomitante con la organización celular para generar estructuras funcionales (Gilbert, 2016). En el caso del desarrollo embrionario de la extremidad, para poder formar las estructuras esqueléticas es necesario que las células indiferenciadas se alejen de las señales emitidas por la AER y se induzca la activación genes maestros del linaje condrogénico.

Centrándonos principalmente en la diferenciación a condrocitos los resultados obtenidos en la qRT-PCR mostraron un incremento significativo de la expresión de *Sox9* en comparación con los demás genes de la condrogénesis. La elevada expresión de *Hif1 $\alpha$* , sugiere un papel regulador hacia *Sox9*, por lo tanto, también en la consecutiva expresión de *Gdf5*, *Acan* y *Col2a1*, quienes presentaron una baja expresión. Se ha sugerido que *Hif1 $\alpha$*  es necesario para la diferenciación de las células progenitoras en condiciones de hipoxia, ya que se une al promotor de *Sox9* y regula su expresión (Amarilio et al., 2007). Estas observaciones sugieren que el estado de compromiso de las MSC hacia el linaje condrogénico aún es temprano, y por ello la expresión de genes que se traducen en proteínas de ECM aún no se inicia. Esta evaluación molecular se vio reflejada en las histologías y en las tinciones de azul. Adicional a esto, la falta de condensaciones evidentes a las 24 hpo podrían verse influidas por la baja expresión de *Gdf5*, proteína involucrada en la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la condensación de las células como son N-Cadherina y N-CAM (Crossin et al., 1985). En concordancia con estos resultados, estudios anteriores realizados en cultivos *in vitro* de MSC provenientes de placenta han reportado que este tipo de células tienen una diferenciación preferencial hacia el linaje condrogénico (Igura et al., 2004).

Por otro lado, la evaluación de las ER-PL a tiempos más largos, demostró que a partir de las 72 hpo comienzan a tener un aumento de tamaño más evidente. Estas observaciones sugieren que, en comparación con lo reportado en ER con mesodermo de extremidades de pollo las cuales aumentan su tamaño considerablemente a partir de las 24 hpo, es posible que el

proceso de diferenciación y morfogénesis de las MSC placentarias en las ER es más lento. Una posible explicación es que las MSC no estén comprometidas a los linajes presentes en la extremidad, a diferencia de las células mesodérmicas del primordio y, por lo tanto, deban establecer el loop de retroalimentación con el ectodermo para poder comprometerse a los linajes de la extremidad embrionaria. Debido a esto, la expresión de los genes involucrados en la codificación de moléculas de adhesión que permiten las condensaciones, también podría iniciarse más adelante en el tiempo.

Por otro lado, la expresión de los genes de diferenciación tenogénica *Scx* y *Mkx*, fue baja en comparación con *Sox9*. No obstante, *Mkx* tuvo una expresión más elevada en comparación de *Scx*. Esto resulta interesante, ya que se ha reportado que *Mkx* está río abajo de *Scx* en la cascada molecular de la tenogénesis en el desarrollo de la extremidad (Liu et al., 2014; Schweitzer et al., 2001). *Scx* es el gen que inicia la especificación de los progenitores de tendones, mientras que *Mkx* junto con *Erg1* y *Erg2* son los factores de transcripción que desencadenan el comienzo de la diferenciación y maduración del tendón (Ito et al., 2010; Lejard et al., 2011). Se ha reportado en cultivos de MSC de médula ósea que *Mkx* podría tener un papel independiente de *Scx* en el proceso de diferenciación hacia tendones, ya que es capaz de inducir la síntesis de COL1A1, tenascina X (TNXB) y decorina (DCN) (Otabe et al., 2015). Con esta información no se descarta que, en el sistema de ER, las MSC de placenta estén iniciando un compromiso hacia tendones independiente de *Scx*. Sin embargo, es necesario evaluar genes como *Coll1a1*, *Tnxb* y *Dcn* para dar continuidad a la inducción de la tenogénesis por *Mkx* en las ER-PL.

Finalmente, la inducción de la expresión de *Runx2* observada en las ER-PL, concuerda con la capacidad osteogénica de las MSC placentarias que ha sido reportada previamente en condiciones *in vitro*. Al analizar en conjunto los resultados de la capacidad de compromiso de las ER-PL, se pueden interpretar que posiblemente dentro de la población de MSC existan subpoblaciones, las cuales presentan distintas capacidades de interpretar las señales que dirigen su compromiso celular de manera preferencial hacia cierto linaje. En ese sentido, una posibilidad es que en las MSC placentarias está presente una subpoblación con mayor capacidad para diferenciarse al linaje condrogénico y otra con mayor capacidad de diferenciarse hacia el linaje osteogénico. Por lo que las MSC de placenta pudieran ser consideradas un grupo de células heterogéneas con distintos potenciales de diferenciación.

En concordancia con esta interpretación, el patrón de expresión de *Fgf-8* en las ER-PL no corresponde al patrón que va a lo largo de la AER, si no que se encuentra de forma discontinua en zonas anteriores y posteriores. Este patrón de expresión y la integridad del ectodermo sugieren que se logra mantener el loop de retroalimentación al menos por 24 hpo, sin embargo, no toda la población de MSC son competentes a las señales exógenas del ectodermo o bien, no responden promoviendo la expresión de *Fgf-8*. Estos resultados refuerzan el argumento de que son una población heterogénea y al ser una población celular que no está comprometida a los linajes del primordio de la extremidad, se pierde el loop de retroalimentación con el ectodermo. Algunos trabajos sugieren que las células mesenquimales pre-migratorias aisladas de la cresta neural craneal son competentes a las señales de FGF-8 tanto en cultivos *in vitro* como *in vivo*. La sobreexpresión de *Fgf-8* en embriones de ratón mantiene a las células en proliferación, además de mantenerlas en estado progenitor y multipotente (Shao et al., 2015), lo que nos permitiría sugerir que las MSC placentarias son capaces de responder a las señales de la AER. Otra posible interpretación es que las MSC de placenta no expresen *Fgf-10*, necesario para la activación y mantenimiento de la expresión de *Fgf-8* (Ohuchi et al., 1997). Se ha caracterizado un tipo de progenitor mesenquimal en pulmones positivo a *Fgf-10* (el Agha et al., 2014), pero no hay evidencia de que se exprese en placenta. A falta de estas moléculas, podría perderse tanto la señalización de *Fgf-8*, como las señales del mesodermo que permiten el engrosamiento del ectodermo. Se sugiere que en ausencia de *Fgf-8* en las ER-PL, un factor que induce la proliferación y sobrevivencia de las células, las MSC placentarias podrían sufrir apoptosis. Tomando esta premisa, si la expresión de *Fgf-8* está presente en zonas próximo-anteriores y próximo-posteriores, las células ectodérmicas en estas zonas son aquellas que logran establecer una retroalimentación y, por ende, inducir a las MSC placentarias a proliferar y adquirir un compromiso celular. Las células ectodérmicas en zonas distales en las que no se expresa *Fgf-8* podrían ser las primeras células que comiencen a sufrir muerte celular, como se observa en los resultados de este proyecto.

Finalmente, el aumento de tamaño de las ER-PL en los tiempos más largos sugiere hay un punto en el tiempo en el que las MSC de placenta logran adaptarse al sistema morfogenético e iniciar un proceso de diferenciación a los linajes mesodérmicos de la extremidad. Los

resultados que se reportan en este proyecto son de relevancia ya que no se había evaluado su potencial morfogenético, por lo que, aquí comprobamos que las MSC de placenta tienen potencial para iniciar un proceso de organización temprana dentro de un sistema *in vivo*.

## **12. Conclusiones**

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que las MSC placentarias pueden sobrevivir en un injerto interespecie durante 24, 48 y 72 horas, mostrando ser competentes a las señales que dirigen el desarrollo de las extremidades. Estas señales permiten que las MSC de placenta adquieran un compromiso celular, se condensan y se inicie el proceso de compromiso hacia de los linajes mesodérmicos, preferencialmente hacia el linaje condrogénico. Además, exhibieron una capacidad de organizarse en tres dimensiones. Este comportamiento de las MSC sugiere que no es necesario someterlas previamente a cultivos de inducción *in vitro* para favorecer su diferenciación.

Por último, comprobamos que la técnica de extremidades recombinantes tiene el potencial de ser utilizada como una herramienta que ayude a evaluar las capacidades de diferenciación y morfogénesis de otras poblaciones celulares como son las ESC, ASC u otras células progenitoras. Las extremidades recombinantes resultan ser una herramienta prometedora para sentar las bases celulares y moleculares que rigen los procesos de diferenciación y morfogénesis en diversos tipos de células progenitoras.

## **Perspectivas**

Sería interesante evaluar si el cultivar las MSC de placenta en un medio de inducción influye en su comportamiento y en su destino celular dentro del sistema de extremidades recombinantes, así, comprobar si hiciese más eficiente el proceso de diferenciación y su organización.

Una perspectiva de este trabajo es evaluar el comportamiento de las MSC placentarias en las ER por periodos más largos de tiempo y comprobar si las MSC continúan su compromiso celular hacia los linajes descritos y si las estructuras esqueléticas adquieren mayor complejidad. Por otro lado, también sería interesante evaluar si otras señales provenientes del embrión hospedero, por ejemplo, el ácido retinoico de las somitas influye en la diferenciación y el patrón morfogenético que muestran las ER-PL.

## 13. Apéndices

### 13.1 Anexo: Soluciones para realizar las extremidades recombinantes

<b>Tripsina al 0.5%</b>	
Tripsina	0.5 gr
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL

<b>SFB al 10%</b>	
Suero fetal bovino	1 mL
PBS	9 mL

### 13.2 Anexo: Soluciones para tinción azul alciano

<b>Alcohol ácido</b>	
Etanol 70%	99 mL
HCl	1 mL

<b>Azul alciano 1%</b>	
Alcohol ácido	80 mL
Azul alciano	1 gr
Aforar a 100 mL con alcohol ácido	

<b>TCA al 5%</b>	
Ácido tricloroacético	5 gr
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

### 13.3 Anexo: Soluciones para microscopía electrónica de barrido

<b>Solución buffer de lavado de cacodilato de sodio 0.2M</b>	
Solución A:	
Cacodilato de sodio trihidratado	42.8 gr
Agua destilada	1 L
Solución B:	
Ácido clorhídrico	10 mL
Agua destilada	500 mL
Por cada 50 mL de solución A se diluyen 2.7 mL de solución B y se ajusta pH= 7.4	

<b>Solución de tetraóxido de osmio al 2%</b>	
Agua destilada	50 mL
Tetraóxido de osmio (cristales)	1 gr
Se cierra con parafilm y se deja agitando suavemente a temperatura ambiente y protegido de la luz por 24 horas	



<b>Solución lavadora de buffer de cacodilato 0.1M</b>	
Se afora la solución stock (52.7 mL) a 100 mL con agua destilada	

<b>Solución osmicante de tetraóxido de osmio al 1%</b>	
1 parte de solución de buffer de lavado se disuelve en una parte igual de solución de tetraóxido de osmio (velocidad de penetración: 1 mm/hora)	

<b>Solución de glutraldehído al 2.5%</b>	
10 mL de glutaraldehído al 2.5% en 90 mL de solución de trabajo (cacodilato 0.1M)	

### 13.4 Anexo: Soluciones para hibridación in situ

<b>PBT (PBS - tween 0.1%)</b>	
PBS	100 mL
Tween 10	100 µL
En agitación con agitador magnético	

<b>PFA al 4%</b>	
Paraformaldehido	4 gr
NaOH 10N	0.10 mL
PBS 10x	100 mL
Filtrar la solución con un filtro de watman	
Aforar la solución con agua desionizada y almacenar en alícuotas a -20°C	

<b>PBS (Buffer de fosfatos salinos) 1X</b>	
NaCl	0.8 gr
KCl	0.2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 gr
H <sub>2</sub> O bidestilada	800 mL
Ajustar pH a 7.4 con HCl	
Aforar a 1000 mL con agua bidestilada y esterilizar en autoclave	

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% en PBT</b>	<b>5 mL</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> comercial (30%)	1 mL
PBT	4 mL
Se debe mantener en refrigeración y en oscuridad	

<b>Proteinasa K (µg/mL)</b>	<b>X= 10 gr/mL</b>
Proteinasa K	$y \text{ mL} = \frac{\left(x \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) (1 \text{ mL})}{1000 \mu\text{g/mL}}$
Esta se adapta según la sonda. Una concentración X aceptable para iniciar pruebas de una sonda nueva es 10 µg/mL	

<b>Solución de PFA 4% con Glutaraldehido 0.2%</b>	
PFA 4%	4.60 mL
Glutaraldehido	40 $\mu$ L

<b>Buffer de hibridación</b>	
<b>Formamida 100%</b>	<b>75 mL</b>
Formamida 100%	37.5 mL
SSC 20X pH 4.5	18.75 mL
SDS 10%	7.5 mL
tRNA 10 $\eta$ /mL	375 $\eta$ L
Heparina	375 $\eta$ L
Agua miliQ estéril	10.5 mL

<b>Sonda diluida en buffer de hibridación (~<math>\eta</math>g/<math>\mu</math>L)</b>	
<b>Sonda concentrada</b>	<b>2 mL</b>
Sonda concentrada	20 $\eta$ L
Buffer de hibridación	198 $\mu$ L

<b>Solución I</b>	
<b>Formamida 100%</b>	<b>40 mL</b>
Formamida 100%	20 mL
SSC 20X pH 4.5	8 mL
SCS 10%	4 mL
Agua miliQ	8 mL

<b>Solución III</b>	
<b>Formamida 100%</b>	<b>40 mL</b>
Formamida 100%	20 mL
SSC 20X pH 4.5	4 mL
Agua miliQ	16 mL

<b>Levamisole 2mM en TBST</b>	
<b>Tris 1M pH 7.5</b>	<b>100 mL</b>
Tris 1M pH 7.5	5 mL
NaCl 5M	3 mL
KCl 1M	1 mL
Tritón	1 mL
Levamisole 200mM	1 mL
Agua miliQ	89 mL

<b>NTMT + 1 mM levamisol</b>	
<b>Tris 1M pH 9.5</b>	<b>40 mL</b>
Tris 1M pH 9.5	4 mL
MgCl <sub>2</sub> 1M	2 mL
NaCl 5M	0.8 mL
Tween 20	0.04 mL
Levamisole 200 mM	2 mL
Agua miliQ	32.96 mL

### 13.5 Anexo: Soluciones para LysoTracker

<b>LysoTracker</b>	<b>PBS</b>
1 μL de lysotracker	1 mL de PBS

<b>Solución I</b>	<b>30 ml</b>
<b>Bencil benzoato</b>	<b>20 ml</b>
<b>Bencil benzol</b>	<b>10 ml</b>

<b>Solución II</b>	<b>30 ml</b>
<b>Metanol absoluto</b>	<b>15 ml</b>
<b>Solución I</b>	<b>15 ml</b>

### 13.6 Anexo: Secuencias de primers para qRT-PCR

<i>Mhc</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	AGGACGGTTCTCACACCATC
Reverse	GATGTAATCCTTGCCGTCGT
<i>Gdf5</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	TCCAGACCCTGATGAACTCC
Reverse	TCCACGACCATGTCCTCATA
<i>Sox9</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	AACAAGCCACACGTCAAGC
Reverse	TCTTCTCGCTCTCGTTCAGC
<i>Col2a1</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	TCCAGATGACCTTCCTACGC
Reverse	AGCTGCTTCGTCCAGATAGG
<i>Agrecan</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	CAAGTGGTTCCTGGTGTGG
Reverse	GCTCGGTGGTGA ACTCTAGG
<i>Mohawk</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	CGTATTGGAAGGAGATCAACG
Reverse	GGACGACTTCTGGATGATGC
<i>Scleraxis</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	GCACCAACAGCGTGAACA
Reverse	GGTGCGAGATGTAGCTGGAG
<i>Hif1-α</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	GAAGGTATTGCACTGCACAGG
Reverse	AGCACCAAGCAGGTCATAGG
<i>Runx2</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	TTCTCCAACCCACGATGCA
Reverse	GGTGTGGTAGTGAGTGGTGG
<i>Efl-α</i>	<b>Secuencia</b>
Foward	AGATTGATCGCCGTTCTGGT
Reverse	CAGCAAAGCGACCCAAAGG

### 13.7 Anexo: Soluciones para inmunofluorescencia y anticuerpos para Sox9, Scx y HLA

<b>Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1mM + NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> 50mM pH=5</b>	
NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> 50mM	150 mL
Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1mM	0.0024 gr

<b>Tritón 0.3%</b>	
PBS	300 µL
Tritón	100 mL

<b>Anticuerpos</b>	
Primario: α-Sox9	1:250 en PBS
Secundario: α-rabbit Cy3	1:250 en PBS
Primario: α-Scx	1:250 en PBS
Secundario: α-rabbit Cy3	1:250 en PBS
Primario: α-HLA ratón	1:250 en PBS
Secundario: α-ratón Alexa 555	1:250 en PBS

## 14. Referencias Bibliográficas

- Akiyama, R., Kawakami, H., Wong, J., Oishi, I., Nishinakamura, R., & Kawakami, Y. (2015). Sall4-Gli3 system in early limb progenitors is essential for the development of limb skeletal elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(16), 5075–5080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421949112>
- Amarilio, R., Viukov, S. v., Sharir, A., Eshkar-Oren, I., Johnson, R. S., & Zelzer, E. (2007). HIF1 $\alpha$  regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*, 134(21), 3917–3928. <https://doi.org/10.1242/dev.008441>
- Apponi, L. H., Corbett, A. H., & Pavlath, G. K. (2011). RNA-binding proteins and gene regulation in myogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(11), 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.004>
- Atala A, Lanza R (2013). Handbook of Stem Cells. Academic Press. p. 452. ISBN 978-0-12-385943-3.
- Balcuns, A., Gasseling, M. T. and Saunders, J. W., JR. (1970). Spatio-temporal distribution of a zone that controls anteroposterior polarity in the limb bud of the chick and other bird embryos. *Amer. Zoo.* 10, 323.
- Brent, A. E., Braun, T., & Tabin, C. J. (2005). Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development*, 132(3), 515–528. <https://doi.org/10.1242/dev.01605>
- Brent, A. E., Schweitzer, R., and Tabin, C. J. (2003). A Somitic Compartment of Tendon Progenitors ates the hypaxial myotome, source of the limb, limb. *Cell* 113, 235–248.
- Buxton, P., Edwards, C., Archer, C. W., and Francis-West, P. (2001). Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 83-A Suppl 1, S23-30.
- Capdevila, J., & Belmonte, J. C. I. (2001). Patterning Mechanisms Controlling Vertebrate Limb Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.87>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Chang, S. C., Hoang, B., Thomas, J. T., Vukicevic, S., Luyten, F. P., Ryba, N. J. P., Kozak, C. A., Reddi, A. H., & Moos, M. (1994). Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28227–28234. PMID: 7961761.
- Chimal-Monroy, J., & Díaz de León, L. (1999). Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilage condensations. *The International Journal of Developmental Biology*, 43(1), 59–67. <https://doi.org/10.1387/ijdb.12455618>
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Gañan, Y., Macias, D., Merino, R., & Hurler, J. M. (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Developmental Biology*, 257(2), 292–301. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00066-6)
- Colnot, C., Lu, C., Hu, D., & Helms, J. A. (2004). Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Developmental Biology*, 269(1), 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.011>

- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H. J., Giacobino, J. P., Lazzari, L., ... Péault, B. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- Crossin, K. L., Chuong, C.-M., & Edelman, G. M. (1985). Expression sequences of cell adhesion molecules (embryogenesis/embryonic induction/histogenesis/cell Interactions). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6942–6946. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6942>
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., & Martin, G. R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, 84(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80999-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80999-X)
- da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5–6), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>
- Dollé, P., Izpisua-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Renucci, A., & Duboule, D. (1989). Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature*, 342(6251), 767–772. <https://doi.org/10.1038/342767a0>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Eames, B. F., Sharpe, P. T., & Helms, J. A. (2004). Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Developmental Biology*, 274(1), 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.006>
- Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M.-A., Teillet, M.-A., & Duprez, D. (2002). Fgf4 Positively Regulates scleraxis and Tenascin Expression in Chick Limb Tendons. *Developmental Biology*, 247(2), 351–366. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0707>
- el Agha, E., Herold, S., Alam, D. al, Quantius, J., MacKenzie, B., Carraro, G., et al. (2014). Fgf10 -positive cells represent a progenitor cell population during lung development and postnatally. *Development* 141, 296–306. doi:10.1242/dev.099747.
- Elisa Piedra, M., Borja Rivero, F., Fernandez-Teran, M., & Ros, M. A. (2000). Pattern formation and regulation of gene expressions in chick recombinant limbs. *Mechanisms of Development*, 90(2), 167–179. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00247-6)
- Erices, A., Conget, P., & Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109(1), 235–242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>
- Fallon, J., & Simandl, K. B. (1984). Interactions between chick limb bud mesoderm and reptile ectoderm result in limb outgrowth in the limbless mutant. *Anatomical Records*, 208(3), A53-A54.
- Fajardo-Orduña, G. R., Mayani, H., Flores-Guzmán, P., Flores-Figueroa, E., Hernández-Estévez, E., Castro-Manrreza, M., Piña-Sánchez, P., Arriaga-Pizano, L., Gómez-Delgado, A., Alarcón-Santos, G., Balvanera-Ortiz, O., & Montesinos, J. J. (2017). Human mesenchymal stem/stromal cells from umbilical cord blood and placenta exhibit similar capacities to promote expansion of hematopoietic progenitor cells in vitro. *Stem*

- Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6061729>
- Fernandez-Teran, M., Piedra, M. E., Ros, M. A., & Fallon, J. F. (1999). The recombinant limb as a model for the study of limb patterning, and its application to muscle development. *Cell and Tissue Research*, 296(1), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s004410051273>
- Frederick, J. M., & Fallon, J. F. (1982). The proportion and distribution of polarizing zone cells causing morphogenetic inhibition when coaggregated with anterior half wing mesoderm in recombinant limbs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, Vol. 67(1975), 13–25. <https://doi.org/10.1242/dev.67.1.13>
- Friedenstein, A. J. (1980). Stromal Mechanisms of Bone Marrow: Cloning in Vitro and Replantation in Vivo (pp. 19–29). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-67319-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-67319-1_3)
- Friedenstein, A. J., Ivanov-Smolenski, A. A., Chajlakjan, R. K., Gorskaya, U. F., Kuralesova, A. I., Latzinik, N. W., & Gerasimow, U. W. (1978). Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental Hematology*, 6(5), 440–444. PMID: 350596.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. v, Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230–247. PMID: 5654088.
- Fromental-Ramain, C., Warot, X., Lakkaraju, S., Favier, B., Haack, H., Birling, C., Dierich, A., Dolle, P., & Chambon, P. (1996). Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development*, 122(2), 461–472. <https://doi.org/10.1242/dev.122.2.461>
- Galli, A., Robay, D., Osterwalder, M., Bao, X., Bénazet, J. D., Tariq, M., Paro, R., Mackem, S., & Zeller, R. (2010). Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genetics*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000901>
- García-García, R. D. (2022). Generación de extremidades recombinantes con células estromales mesenquimales provenientes de sangre de cordón umbilical. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de México) Repositorio Institucional - Universidad Autónoma de México.
- Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., & Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, 5(6), 623–628. <https://doi.org/10.1038/9467>
- Gilbert, S. F. (2016). *Developmental Biology -- NCBI Bookshelf*. Developmental Biology.
- Grieshammer, U., Minowada, G., Pisenti, J. M., Abbott, U. K., & Martin, G. R. (1996). The chick limbless mutation causes abnormalities in limb bud dorsal-ventral patterning: Implications for the mechanism of apical ridge formation. *Development*, 122(12), 3851–3861. <https://doi.org/10.1242/dev.122.12.3851>
- Haro, E., Delgado, I., Junco, M., Yamada, Y., Mansouri, A., Oberg, K. C., & Ros, M. A. (2014). Sp6 and Sp8 Transcription Factors Control AER Formation and Dorsal-Ventral Patterning in Limb Development. *PLoS Genetics*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004468>
- Harris, V. K., Stark, J., Vyshkina, T., Blackshear, L., Joo, G., Stefanova, V., Sara, G., & Sadiq, S. A. (2018). Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine*, 29, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.002>
- Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (1992). Characterization

- of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(92\)90364-3](https://doi.org/10.1016/8756-3282(92)90364-3)
- Horwitz, E. M., le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395. doi: 10.1080/14653240500319234.
- Hung, I. H., Yu, K., Lavine, K. J., & Ornitz, D. M. (2007). FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Developmental Biology*, 307(2), 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.048>
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., & Takahashi, T. A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6(6), 543–553. <https://doi.org/10.1080/14653240410005366-1>
- Isaac, A., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A., Altabef, M., Tsukui, T., Patel, K., et al. (1998). Tbx genes and limb identity in chick embryo development. *Development* 125, 1867–1875. doi: 10.1242/dev.125.10.1867.
- Ito, Y., Toriuchi, N., Yoshitaka, T., Ueno-Kudoh, H., Sato, T., Yokoyama, S., Nishida, K., Akimoto, T., Takahashi, M., Miyaki, S., & Asahara, H. (2010). The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10538–10542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000525107>
- Itou, J., Kawakami, H., Quach, T., Osterwalder, M., Evans, S. M., Zeller, R., & Kawakami, Y. (2012). Islet1 regulates establishment of the posterior hindlimb field upstream of the Hand2-Shh morphoregulatory gene network in mouse embryos. *Development*, 139(9), 1620–1629. <https://doi.org/10.1242/dev.073056>
- Iwanami, S., & Iwami, S. (2018). Quantitative immunology by data analysis using mathematical models. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (Vols. 1–3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20250-1>
- Jang, M. J., Kim, H. S., Lee, H. G., Kim, G. J., Jeon, H. G., Shin, H. S., Chang, S. K., Hur, G. H., Chong, S. Y., Oh, D., & Chung, H. M. (2013). Placenta-derived mesenchymal stem cells have an immunomodulatory effect that can control acute graft-versus-host disease in mice. *Acta Haematologica*, 129(4), 197–206. <https://doi.org/10.1159/000345267>
- Jin, L., & Li, X. (2013). Growth Differentiation Factor 5 Regulation in Bone Regeneration. *Current Pharmaceutical Design*, 19(19), 3364–3373. <https://doi.org/10.2174/1381612811319190003>
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., & Verfaillie, C. M. (2007). Erratum: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 447(7146), 880–881. <https://doi.org/10.1038/nature05812>
- Kamiya, N., Watanabe, H., Habuchi, H., Takagi, H., Shinomura, T., Shimizu, K., & Kimata, K. (2006). Versican/Pg-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2390–2400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509341200>
- Keene, D. R., Engvall, E., & Glanville, R. W. (1988). Ultrastructure of type VI collagen in



- human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *Journal of Cell Biology*, 107(5), 1995–2006. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1995>
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Peña, J., Johnson, R. L., Belmonte, J. C. I., & Tabin, C. J. (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, 280(5367), 1274–1277. <https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1274>
- Kesseland, M., & Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell*, 67(1), 89–104. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90574-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90574-I)
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J. K., Arruda, E. P., Kathiriya, I. S., Mo, R., Hui, C. C., Srivastava, D., & Bruneau, B. G. (2006). Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nature Genetics*, 38(2), 175–183. <https://doi.org/10.1038/ng1707>
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937), 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>
- Kuhlman, J., & Niswander, L. (1997). Limb deformity proteins: Role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development*, 124(1), 133–139. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.133>
- Kuhn, H. G., and Svendsen, C. N. (1999). Origins, functions, and potential of adult neural stem cells. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 21, 625–30. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199908)21:8<625::AID-BIES1>3.0.CO;2-6.
- Kwon, A., Kim, Y., Kim, M., Kim, J., Choi, H., Jekarl, D. W., Lee, S., Kim, J. M., Shin, J. C., & Park, I. Y. (2016). Tissue-specific differentiation potency of mesenchymal stromal cells from perinatal tissues. *Scientific Reports*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23544>
- Lassar, A. B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D., & Weintraub, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 58(5), 823–831. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90935-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90935-5)
- Lefebvre, V., Li, P., & De Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO Journal*, 17(19), 5718–5733. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5718>
- Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.-J., Bonnet, A., Bonnin, M.-A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C. B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, P., Rossert, J., Ruggiero, F., & Duprez, D. (2011). EGR1 and EGR2 Involvement in Vertebrate Tendon Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5855–5867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.153106>
- Li, D., Sakuma, R., Vakili, N. A., Mo, R., Puvindran, V., Deimling, S., Zhang, X., Hopyan, S., & Hui, C. chung. (2014). Formation of proximal and anterior limb skeleton requires early function of Irx3 and Irx5 and is negatively regulated by shh signaling. *Developmental Cell*, 29(2), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.001>
- Liu, H., Zhu, S., Zhang, C., Lu, P., Hu, J., Yin, Z., Ma, Y., Chen, X., & OuYang, H. (2014). Crucial transcription factors in tendon development and differentiation: their potential for tendon regeneration. *Cell and Tissue Research*, 356(2), 287–298. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1834-8>

- Li, Y., Hibbs, M. A., Gard, A. L., Shylo, N. A., and Yun, K. (2012). Genome-Wide Analysis of N1ICD/RBPJ Targets In Vivo Reveals Direct Transcriptional Regulation of Wnt, SHH, and Hippo Pathway Effectors
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M., & Joyner, A. L. (1996). The mouse *Engrailed-1* gene and ventral limb patterning. In *Nature* (Vol. 382, Issue 6589, pp. 360–363). <https://doi.org/10.1038/382360a0>
- Loomis, Cynthia A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J., & Joyner, A. L. (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development*, 125(6), 1137–1148. <https://doi.org/10.1242/dev.125.6.1137>
- Lorda Diez, C. I. (2010). *Análisis del papel de los TGFβs en el desarrollo de las extremidades* [Universidad de Cantabria]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=181630>
- Maccabe, A. B., Gasseling, M. T., & Saunders, J. W. (1973). Spatiotemporal distribution of mechanisms that control outgrowth and anteroposterior polarization of the limb bud in the chick embryo. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2(C), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(73\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0047-6374(73)90002-X)
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., & Martin, G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*, 453(7193), 401–405. <https://doi.org/10.1038/nature06876>
- Marín-Llera, J. C. (2018). Identificación y caracterización de una subpoblación de células mesenquimales multipotentes Sca<sup>+</sup> de la extremidad embrionaria de ratón. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de México) Repositorio Institucional - Universidad Autónoma de México.
- Marín-Llera, J. C., Garcíadiego-Cázares, D., & Chimal-Monroy, J. (2019). Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms That Control Early Cell Fate Decisions During Appendicular Skeletogenesis. *Frontiers in Genetics*, 10(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00977>
- Marín-Llera, J. C., Fernández-Calderón, M., & Chimal-Monroy, J. (2022). Chicken Recombinant Limbs Assay to Understand Morphogenesis, Patterning, and Early Steps in Cell Differentiation. *Journal of Visualized Experiments*, 179. <https://doi.org/10.3791/63183>
- Maroto, M., Reshef, R., Münsterberg, A. E., Koester, S., Goulding, M., & Lassar, A. B. (1997). Ectopic Pax-3 Activates MyoD and Myf-5 Expression in Embryonic Mesoderm and Neural Tissue. *Cell*, 89(1), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80190-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80190-7)
- Menko, A. S., & Boettiger, D. (1987). Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell*, 51(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90009-2)
- Merino, R., Rodríguez-Leon, J., Macías, D., Gañan, Y., Economides, A. N., & Hurler, J. M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126(23), 5515–5522. <https://doi.org/10.1242/dev.126.23.5515>
- Minguillon, C., Nishimoto, S., Wood, S., Vendrell, E., Gibson-Brown, J. J., & Logan, M. P. O. (2012). Hox genes regulate the onset of Tbx5 expression in the forelimb. *Development (Cambridge)*, 139(17), 3180–3188. <https://doi.org/10.1242/dev.084814>
- Montavon, T., Le Garrec, J. F., Kerszberg, M., & Duboule, D. (2008). Modeling Hox gene regulation in digits: Reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes*

- and Development*, 22(3), 346–359. <https://doi.org/10.1101/gad.1631708>
- Montero, J. A., & Hurlé, J. M. (2007). Deconstructing digit chondrogenesis. *BioEssays*, 29(8), 725–737. <https://doi.org/10.1002/bies.20607>
- Montero, J. A., & Hurlé, J. M. (2010). Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis*, 15(3), 365–375. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0444-5>
- Montero, J. A., Gañan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A., & Hurlé, J. M. (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development*, 128(11), 2075–2084. <https://doi.org/10.1242/dev.128.11.2075>
- Montero, Juan A., Lorda-Diez, C. I., Sanchez-Fernandez, C., & Hurlé, J. M. (2020). Cell death in the developing vertebrate limb: A Locally regulated mechanism contributing to musculoskeletal tissue morphogenesis and differentiation. *Developmental Dynamics*, 17(11), dvyd.237. <https://doi.org/10.1002/dvdy.237>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Mujtaba, T., Piper, D. R., Kalyani, A., Groves, A. K., Lucero, M. T., and Rao, M. S. (1999). Lineage-Restricted Neural Precursors Can Be Isolated from Both the Mouse Neural Tube and Cultured ES Cells. *Developmental Biology* 214, 113–127. doi:10.1006/dbio.1999.9418.
- Murchison, N. D., Price, B. A., Conner, D. A., Keene, D. R., Olson, E. N., Tabin, C. J., & Schweitzer, R. (2007). Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development*, 134(14), 2697–2708. <https://doi.org/10.1242/dev.001933>
- Najimi, M., Khuu, D. N., Lysy, P. A., Jazouli, N., Abarca, J., Sempoux, C., & Sokal, E. M. (2007). Adult-Derived Human Liver Mesenchymal-Like Cells as a Potential Progenitor Reservoir of Hepatocytes? *Cell Transplantation*, 16(7), 717–728. <https://doi.org/10.3727/000000007783465154>
- Nakahara, H., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (1991). Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(4), 465–476. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090402>
- Ng, I. C., Pawijit, P., Tan, J., & Yu, H. (2018). Anatomy and physiology for biomaterials research and development. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering* (Vols. 1–3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99876-3>
- Niswander, L., & Martin, G. R. (1992). Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development*, 114(3), 755–768. <https://doi.org/10.1242/dev.114.3.755>
- Ohuchi, H., & Noji, S. (1999). Fibroblast-growth-factor-induced additional limbs in the study of initiation of limb formation, limb identity, myogenesis, and innervation. *Cell and Tissue Research*, 296(1), 45–56. <https://doi.org/10.1007/s004410051265>
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., & Noji, S. (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, 124(11), 2235–2244. <https://doi.org/10.1242/dev.124.11.2235>
- Osterwalder, M., Speziale, D., Shoukry, M., Mohan, R., Ivanek, R., Kohler, M., Beisel, C., Wen, X., Scales, S. J., Christoffels, V. M., Visel, A., Lopez-Rios, J., & Zeller, R. (2014).

- HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Developmental Cell*, 31(3), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.018>
- Otabe, K., Nakahara, H., Hasegawa, A., Matsukawa, T., Ayabe, F., Onizuka, N., Inui, M., Takada, S., Ito, Y., Sekiya, I., Muneta, T., Lotz, M., & Asahara, H. (2015). Transcription factor Mohawk controls tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jor.22750>
- Owen, M., & Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium*, 136, 42–60. <https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4>
- Pautou, M. P. (1973). Analyse de la morphogenèse du pied des oiseaux à l'aide de mélanges cellulaires interspécifiques. I. Etude morphologique. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 29(1), 175–196.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Poole, A. R., Pidoux, I., Reiner, A., Tang, L. H., Choi, H., & Rosenberg, L. (1980). Localization of proteoglycan monomer and link protein in the matrix of bovine articular cartilage: An immunohistochemical study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 28(7), 621–635. <https://doi.org/10.1177/28.7.6156200>
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K., & Emerson, C. P. (2002). Myogenic Regulatory Factors and the Specification of Muscle Progenitors in Vertebrate Embryos. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 747–783. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105758>
- Probst, S., Kraemer, C., Demougin, P., Sheth, R., Martin, G. R., Shiratori, H., Hamada, H., Iber, D., Zeller, R., & Zuniga, A. (2011). SHH propagates distal limb bud development by enhancing CYP26B1-mediated retinoic acid clearance via AER-FGF signalling. *Development*, 138(10), 1913–1923. <https://doi.org/10.1242/dev.063966>
- Pryce, B. A., Watson, S. S., Murchison, N. D., Staverosky, J. A., Dünker, N., & Schweitzer, R. (2009). Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFB signaling are essential for tendon formation. *Development*, 136(8), 1351–1361. <https://doi.org/10.1242/dev.027342>
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75(7), 1401–1416. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2)
- Ros, M. A., Lyons, G. E., Mackem, S., & Fallon, J. F. (1994). Recombinant Limbs as a Model to Study Homeobox Gene Regulation during Limb Development. *Developmental Biology*, 166(1), 59–72. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1296>
- Roselló-Díez, A., Arques, C. G., Delgado, I., Giovinazzo, G., & Torres, M. (2014). Diffusible signals and epigenetic timing cooperate in late proximo-distal limb patterning. *Development (Cambridge)*, 141(7), 1534–1543. <https://doi.org/10.1242/dev.106831>
- Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, 19(11). <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>
- Ryu, H. H., Kang, B. J., Park, S. S., Kim, Y., Sung, G. J., Woo, H. M., Kim, W. H., & Kweon, O. K. (2012). Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow,

- Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(12), 1617–1630. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0065>
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*, 131(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>
- Saunders, J. W. (1972). Developmental Control of Three-Dimensional Polarity in the Avian Limb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 193(1), 29–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1972.tb27821.x>
- Savage, M. P., Fallon, J. F., Hart, C. E., Riley, B. B., Sasse, J., & Olwin, B. B. (1993). Distribution of FGF-2 suggests it has a role in chick limb bud growth. *Developmental Dynamics*, 198(3), 159–170. <https://doi.org/10.1002/aja.1001980302>
- Saxen, L., Lehtonen, E., Karkinen-Jääskeläinen, M., Nordling, S., & Wartiovaara, J. (1976). Are morphogenetic tissue interactions mediated by transmissible signal substances or through cell contacts? *Nature*, 259(5545), 662–663. <https://doi.org/10.1038/259662a0>
- Schweitzer, R., Chyung, J. H., Murtaugh, L. C., Brent, A. E., Rosen, V., Olson, E. N., Lassar, A., & Tabin, C. J. (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*, 128(19), 3855–3866. <https://doi.org/10.1242/dev.128.19.3855>
- Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PloS One*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076195>
- Shao, M., Liu, C., Song, Y., Ye, W., He, W., Yuan, G., Gu, S., Lin, C., Ma, L., Zhang, Y., Tian, W., Hu, T., & Chen, Y. (2015). FGF8 signaling sustains progenitor status and multipotency of cranial neural crest-derived mesenchymal cells *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(5), 441–454. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv052>
- Shimogori, T., Banuchi, V., Ng, H. Y., Strauss, J. B., and Grove, E. A. (2004). Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* 131, 5639–5647. doi:10.1242/dev.01428.
- Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R. R., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., & Birchmeier, W. (2003). Genetic interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes and Development*, 17(16), 1963–1968. <https://doi.org/10.1101/gad.263003>
- Summerbell, D. (1974). A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb bud. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 32(3), 651–660. <https://doi.org/10.1242/dev.32.3.651>
- Summerbell, D., Lewis, J. H., & Wolpert, L. (1973). Positional Information in Chick Limb Morphogenesis. *Nature*, 244(5417), 492–496. <https://doi.org/10.1038/244492a0>
- Sun, X., Mariani, F. V., & Martin, G. R. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 418(6897), 501–508. <https://doi.org/10.1038/nature00902>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

- Tamamura, Y., Otani, T., Kanatani, N., Koyama, E., Kitagaki, J., Komori, T., Yamada, Y., Costantini, F., Wakisaka, S., Pacifici, M., Iwamoto, M., & Enomoto-Iwamoto, M. (2005). Developmental regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(19), 19185–19195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414275200>
- Tanaka, M. (2013). Molecular and evolutionary basis of limb field specification and limb initiation. *Development Growth and Differentiation*, *55*(1), 149–163. <https://doi.org/10.1111/dgd.12017>
- Te Welscher, P., Fernandez-Teran, M., Ros, M. A., & Zeller, R. (2002). Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes and Development*, *16*(4), 421–426. <https://doi.org/10.1101/gad.219202>
- ten Berge, D., Brugmann, S. A., Helms, J. A., & Nusse, R. (2008). Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*, *135*(19), 3247–3257. <https://doi.org/10.1242/dev.023176>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L. N., Smith, Z., Meissner, A., & Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, *145*(6), 875–889. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.017>
- Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, *14*(2), 213. <https://doi.org/10.2307/3570892>
- Tozer, S., & Duprez, D. (2005). Tendon and ligament: Development, repair and disease. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *75*(3), 226–236. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20049>
- Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development*, *146*(22). <https://doi.org/10.1242/dev.163428>
- Tzchori, I., Day, T. F., Carolan, P. J., Zhao, Y., Wassif, C. A., Li, L. Q., Lewandoski, M., Gorivodsky, M., Love, P. E., Porter, F. D., Westphal, H., & Yang, Y. (2009). LIM homeobox transcription factors integrate signaling events that control three-dimensional limb patterning and growth. *Development*, *136*(8), 1375–1385. <https://doi.org/10.1242/dev.026476>
- Vogel, K. G., & Heinegard, D. (1985). Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(16), 9298–9306. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39366-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39366-3)
- Wang, J., Zhu, H. H., Chu, M., Liu, Y., Zhang, C., Liu, G., Yang, X., Yang, R., & Gao, W. Q. (2014). Symmetrical and asymmetrical division analysis provides evidence for a hierarchy of prostate epithelial cell lineages. *Nature Communications*, *5*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms5758>
- Wellik, D. M., & Capecchi, M. R. (2003). Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science*, *301*(5631), 363–367. <https://doi.org/10.1126/science.1085672>
- Weng, L., Hu, X., Kumar, B., Garcia, M., Todorov, I., Jung, X., Marcucci, G., Forman, S. J., & Chen, C. C. (2016). Identification of a CD133-CD55-population functions as a fetal

- common skeletal progenitor. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38632>
- White, J., & Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*, 1(2), 131–138. <https://doi.org/10.1385/SCR:1:2:131>
- Wojciech, P. (2015). *Histología Texto y Atlas. Correlación con biología molecular y celular*.
- Wolpert, L. (2002). Principles of Development. In *Genetics & Genomic Sciences* (Second Edi, Vol. 1, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.24966/ggs-2485/100001>
- Wu, Y., Wang, G., Scott, S. A., & Capecchi, M. R. (2008). Hoxc10 and Hoxd10 regulate mouse columnar, divisional and motor pool identity of lumbar motoneurons. *Development*, 135(1), 171–182. <https://doi.org/10.1242/dev.009225>
- Xu, B., Hrycaj, S. M., McIntyre, D. C., Baker, N. C., Takeuchi, J. K., Jeannotte, L., Gaber, Z. B., Novitch, B. G., & Wellik, D. M. (2013). Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19438–19443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315075110>
- Xu, B., & Wellik, D. M. (2011). Axial Hox9 activity establishes the posterior field in the developing forelimb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4888–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018161108>
- Yakushiji-Kaminatsui, N., Kondo, T., Hironaka, K. I., Sharif, J., Endo, T. A., Nakayama, M., Masui, O., Koseki, Y., Kondo, K., Ohara, O., Vidal, M., Morishita, Y., & Koseki, H. (2018). Variant prl1 competes with retinoic acid-related signals to repress Meis2 in the mouse distal forelimb bud. *Development (Cambridge)*, 145(19), 1–10. <https://doi.org/10.1242/dev.166348>
- Yang, C., Wang, G., Ma, F., Yu, B., Chen, F., Yang, J., Feng, J., & Wang, Q. (2018). Repeated injections of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells significantly promotes functional recovery in rabbits with spinal cord injury of two noncontinuous segments. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0879-0>
- Yen, B. L., Huang, H.-I., Chien, C.-C., Jui, H.-Y., Ko, B.-S., Yao, M., Shun, C.-T., Yen, M., Lee, M.-C., & Chen, Y.-C. (2005). Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells*, 23(1), 3–9. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0098>
- Yokouchi, Y., Nakazato, S., Yamamoto, M., Goto, Y., Kameda, T., Iba, H., & Kuroiwa, A. (1995). Misexpression of HoxA-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes and Development*, 9(20), 2509–2522. <https://doi.org/10.1101/gad.9.20.2509>
- Young, B. B., Gordon, M. K., & Birk, D. E. (2000). Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: Association with assembly and growth of collagen fibrils. *Developmental Dynamics*, 217(4), 430–439. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200004\)217:4<430::AID-DVDY10>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200004)217:4<430::AID-DVDY10>3.0.CO;2-5)
- Zeller, R., López-Ríos, J., & Zuniga, A. (2009). Vertebrate limb bud development: Moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 10(12), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nrg2681>
- Zhang, F.-J., Luo, W., & Lei, G.-H. (2015). Role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 82, 144–147. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.10.003>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source

- of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>
- Zuniga, A., & Zeller, R. (2020). Dynamic and self-regulatory interactions among gene regulatory networks control vertebrate limb bud morphogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 139. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.02.005>
- Zwilling, E. (1964). Development of fragmented and of dissociated limb bud mesoderm. *Developmental Biology*, 9(1), 20–37. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(64\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(64)90012-0)