



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SUBPOBLACIÓN
DE CÉLULAS MESENQUIMALES MULTIPOTENTES Sca⁺ DE LA
EXTREMIDAD EMBRIONARIA DE RATÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JESSICA CRISTINA MARIN LLERA

TUTOR PRINCIPAL

DR. JESÚS CHIMAL MONROY

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. DIANA ESCALANTE-ALCALDE

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas.

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Ciudad de México. Octubre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

-Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas.

-Marie Curie.

-Science means constantly walking a tightrope between blind faith and curiosity; between expertise and creativity; between bias and openness; between experience and epiphany; between ambition and passion; and between arrogance and conviction - in short, between an old today and a new tomorrow.

-Heinrich Rohrer.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-164682), al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, proyectos IN213314 y IN211117) y a la Fundación Miguel Alemán A. C.

Se agradece el apoyo financiero otorgado por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos además de la Red Temática Células Troncales y Medicina Regenerativa para la realización de una estancia académica en el laboratorio de Apoptosis I dirigido por el Dr. Juan Hurlé en la Universidad de Cantabria, España.

Finalmente, la realización mis estudios de posgrado no hubiera sido posible sin la beca que recibí por parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante todo el programa, por lo cual agradezco el apoyo otorgado.

Agradecimientos profesionales

-Al Dr. Jesús Chimal-Monroy, por acercarme al campo de la biología del desarrollo y mostrarme su belleza. Por todo su apoyo y confianza, sin duda algo invaluable. Por enseñarme que el laboratorio no solo es un lugar en donde se hacen experimentos, sino se construyen ideas.

-A la Dra. Diana Escalante-Alcalde y al Dr. Héctor Mayani-Viveros, por guiarme durante la realización de este proyecto, por todos sus valiosos comentarios y por la discusión generada. Sin duda enriquecedora en todos los aspectos.

-A la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda, por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis. Gracias también por las enseñanzas.

-A la M.V.Z Georgina Díaz Herrera, de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su disposición y trabajo para que siempre tuviera los animales necesarios para realizar experimentos.

-Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por la capacitación otorgada para utilizar los equipos y por su ayuda en la adquisición y mejora de las imágenes relacionadas con este proyecto. Gracias Miguel por tus comentarios.

-Al M. en C. Carlos Castellanos Barba, del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNaCit), por su apoyo en la capacitación para el uso del citómetro de flujo y en la adquisición y separación de las muestras utilizadas en este trabajo.

-A la Lic. Lucía Brito Ocampo, de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el apoyo brindado para conseguir parte del material bibliográfico utilizado en esta tesis.

-A los miembros del laboratorio, porque juntos hemos compartido logros, decepciones y muy buenos momentos: Francisco, Roberto, Brianda, Argelia, Alejandro, Damián, Eliseo, Faviel, Martha, Sabina, Valentina y Paola. Les agradezco a todos, de cada uno de ustedes he aprendido.

Dedicatoria

*A Mathías, mi hijito. Por todo el amor que me das y por todo lo que me haces sentir...soy la persona más feliz de la tierra. Gracias por compartir conmigo tu mundo y tus sonrisas. Gracias por hacerme compañía y por darme tu apoyo en la última etapa de este proceso. Eres mi pequeño motorcito. Te amo muchísimo.

*A Iván, mi cochi. Soy afortunada por tenerte en mi vida. Gracias por ser el mejor esposo y el mejor padre. Por acompañarme en este viaje, por tus comentarios, por lo que hemos compartido y por hacerme muy feliz. Gracias amor por tus enseñanzas...he aprendido mucho de ti. Desde ahora gracias por todo lo que falta. Te amo amor!!!

*A mi Mamá, mi mejor amiga por siempre. No hay palabras suficientes para agradecerte todo lo que haces por mí, por nosotros ahora. Gracias por tus enseñanzas y por tu apoyo siempre, sin reparos y bajo cualquier circunstancia. Gracias a ti, a tu amor, he logrado muchas cosas que he deseado. Gracias por la libertad para elegir. Te amo momo.

*A la memoria de mi padre, porque a pesar de tu ausencia física me sigues enseñando y acompañando. Gracias porque me diste muchos regalos que aún conservo y que me acompañarán por el resto de la vida. Gracias por hacerte presente, sabes a que me refiero. Vives en mis recuerdos y mi corazón.

*A mis hermanos, Ale y Vic...no importa la especie que sean, los amo y amaré toda mi vida. Gracias por su apoyo y por alegrarme los días que nos vemos o hablamos. El sacrificio fue la separación, pero a pesar de eso siempre me sentí unida a ustedes en mente y corazón. Los recuerdos nos unen. Les agradezco tanta felicidad, los amo mucho a ambos!

*A mis sobrinos Hanniel y Gibrhan, mis dos primeros amores. Un día eran tan pequeños y ahora mírense! Tan grandes en todos los aspectos. Con ustedes noto el paso del tiempo y me doy cuenta de lo rápido que suceden las cosas. Gracias por su compañía y por alegrarme el corazón.

*Al más pequeñito de todos: Einar, quien sin duda vino a alegrar más la vida de toda la familia. Tienes un pedazo de mi corazón bebé.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	- 3 -
ÍNDICE DE TABLAS	- 3 -
Resumen	- 4 -
Abstract	- 5 -
I. Introducción.....	- 6 -
1.1 La extremidad embrionaria: un modelo para estudiar los procesos de morfogénesis y de diferenciación celular	- 7 -
1.2 Células mesenquimales estromales multipotentes (MSC): una herramienta para el estudio de subpoblaciones en el primordio de la extremidad	- 16 -
II. Planteamiento del problema y justificación.....	- 20 -
III. Hipótesis.....	- 20 -
IV. Objetivos	- 21 -
V. Materiales y Métodos	- 22 -
Aislamiento y obtención de las células del primordio de la extremidad	- 22 -
Ensayos de citometría de flujo	- 23 -
Inmunofluorescencias	- 24 -
Cultivo celular	- 25 -
PCR en tiempo real.....	- 25 -
Ensayos de diferenciación in vitro	- 26 -
Transfección del plásmido Sca1-GFP	- 27 -
Hibridaciones in situ (HIS).....	- 28 -
Ensayos de diferenciación y morfogénesis in vivo: extremidades recombinantes (ER) ..	- 29 -
Inclusión de muestras en parafina, cortes histológicos y tinción con hematoxilina y eosina ..	- 30 -
Tinción de esqueleto de extremidades recombinantes (ER)	- 30 -
VI. RESULTADOS.....	- 31 -
6.1 Análisis comparativo de las estrategias de obtención de MSC en las células del primordio de la extremidad embrionaria: la importancia de la caracterización directa ...	- 31 -
6.2 Caracterización de subpoblaciones de células mesenquimales multipotentes en la extremidad embrionaria de ratón	- 44 -

VII. DISCUSIÓN	- 57 -
7.1 Métodos de obtención de células que expresan marcadores de MSC en la extremidad embrionaria de ratón	- 57 -
7.2 Caracterización de subpoblaciones mesenquimales multipotentes en la extremidad embrionaria de ratón	- 62 -
VIII. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO	- 69 -
X. APÉNDICES	- 70 -
Anexo 1: Soluciones y colorantes	- 70 -
Anexo 2: Anticuerpos	- 72 -
Anexo 3: Oligonucleótidos para qRT-PCR	- 73 -
Anexo 4: Condiciones de hibridación in situ por sonda utilizada	- 75 -
Anexo 5: Plásmidos y construcciones	- 76 -
Anexo 6: Artículo Publicado	- 77 -
IX. LITERATURA CITADA.....	- 78 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Los marcadores asociados a MSC se expresan en un bajo porcentaje de células recién aisladas de los primordios de extremidades E10.5.....	32 -
Figura 2 Las células recién aisladas de los primordios de extremidades E10.5 expresan niveles bajos de genes de diferenciación osteo-, condro-, teno- y adipogénica	33 -
Figura 3 El porcentaje de células recién aisladas de los primordios que coexpresa los marcadores Sca1 y CD44 es muy bajo.	36 -
Figura 4 La capacidad de diferenciación in vitro de las células de los primordios se modifica después del cultivo.....	38 -
Figura 5 La cantidad de deposiciones de calcio en las células diferenciadas de los primordios está relacionada con el pase en el que se encuentren.....	39 -
Figura 6 La capacidad de diferenciación osteogénica in vitro de las células del primordio se mantiene a partir del pase 5.....	40 -
Figura 7 El cultivo de las células del primordio modifica el perfil de expresión de genes relacionados con diferenciación celular.....	41 -
Figura 8 Los marcadores asociados a MSC se expresan en diversos tejidos del primordio de la extremidad y no únicamente en el mesénquima.	45 -
Figura 9 En el primordio de la extremidad muy pocas células expresan marcadores de células hematopoyéticas.....	46 -
Figura 10 Colocalización de las células CD105 y Flk1 positivas en el primordio de la extremidad.	47 -
Figura 11 En el primordio de la extremidad existen dos subpoblaciones de células mesenquimales que difieren en la expresión del marcador Sca1.....	48 -
Figura 12 Las subpoblaciones sSca ⁺ y sSca ⁻ difieren en su capacidad de diferenciación in vitro.	50 -
Figura 13 Las células sSca ⁺ expresan niveles mayores de genes tempranos de diferenciación osteogénica y miogénica en comparación con las sSca ⁻	51 -
Figura 14 La sobreexpresión del gen Sca1 en las células del primordio inhibe la condrogénesis in vivo.....	54 -
Figura 15 La localización y expresión de los marcadores de MSC se modifica de acuerdo a la etapa del desarrollo.....	56 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparación del porcentaje de expresión de marcadores asociados a MSC en células sin cultivar y células cultivadas a diferentes pases del primordio de la extremidad. El promedio de los datos se muestra expresado como (promedio \pm SD).....	34 -
Tabla 2 Comparación del porcentaje de expresión de los marcadores Sca1 y CD44 en células de primordios cultivadas durante 24h a diferentes densidades iniciales. El promedio de los datos se muestran expresado en porcentaje como (promedio \pm SD).....	35 -
Tabla 3 Comparación del porcentaje de expresión de los marcadores Sca1 y CD44 en células totales provenientes de cabezas y troncos de embriones E105 antes y después de ser cultivadas. Los datos se muestran como promedio \pm SD.....	43 -

Resumen

El estudio de la extremidad embrionaria permite entender los procesos fundamentales de la biología del desarrollo: morfogénesis, control del crecimiento y diferenciación celular. A pesar de que existen muchos trabajos dedicados a esclarecer los mecanismos que las células de la extremidad siguen para organizarse y formar patrones, moldear en conjunto una forma, adquirir una posición determinada y diferenciarse hacia los linajes propios de la extremidad, aún se desconoce cuál es el estado de compromiso inicial de las células que reciben todas las señales que dictan su comportamiento. En este trabajo, se realizó un análisis de la localización y expresión de marcadores de células mesenquimales estromales multipotentes (MSC), con la finalidad de utilizar estos marcadores para identificar y caracterizar subpoblaciones de células mesenquimales en el primordio de la extremidad que pudieran tener características progenitoras o células multipotentes. La comparación entre los métodos de obtención y caracterización de MSC determinó que caracterizar a las células recién aisladas del primordio garantiza un comportamiento cercano al que sucede en la extremidad. Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, muestran que en el primordio temprano existen dos subpoblaciones de células mesenquimales con capacidad de diferenciación multilinaje. Ambas subpoblaciones se encuentran en estados de compromiso diferentes, en donde la expresión del marcador Sca1 tiene un papel importante en la determinación de la adquisición de su destino celular. Este trabajo brinda información para ayudar a entender los mecanismos que controlan la especificación de los destinos celulares durante el desarrollo de la extremidad y poder así establecer una jerarquía de las diferentes poblaciones celulares que van surgiendo durante su desarrollo.

Abstract

The study of the embryonic limb allows to understand fundamental processes of developmental biology: morphogenesis, growth-control and cell differentiation. Although there are many works trying to clarify how the limb cells organize and form patterns, how cells (as a group) form up and acquire a distinctive shape and a specific position differentiating towards the limb lineages, it is still unknown the commitment state of the cells that receive the first signals that dictate their behavior. In this work, an analysis of the localization and expression of multipotent mesenchymal stromal cell (MSC) markers was achieved to identify and characterize mesenchymal progenitor or multipotent cells subpopulations in the limb bud. The comparison between two methods obtaining MSCs determined that the characterization from freshly isolated cells of the limb bud, instead of culture cells method, guarantees a closer cellular behavior similar to the one occurring in the limb. The results obtained *in vitro* and *in vivo* showed that in the early limb bud there are two sub-populations of mesenchymal cells with multilineage differentiation capacity. Both subpopulations are in different commitment states and the expression of the *Sca1* gene plays an important role in determining its cell fate. This work contributes to understand the mechanisms that control cell fate specification during limb development and lays down key technical basis for the study of the cell population hierarchy that arise during its development.

I. Introducción

La diferenciación celular es el proceso a través del cual una célula se especializa y alcanza su forma y función final. Este proceso no solo da como resultado la formación de diversos órganos y tejidos, sino que hace a un organismo completamente funcional. Durante el desarrollo embrionario, la diferenciación comienza con la fertilización del ovocito. Una vez fecundado, en el cigoto ocurren una serie de eventos que conllevan a su división y multiplicación resultando en la formación de una estructura denominada, en caso de los mamíferos, blastocisto. Al mismo tiempo que las células del blastocisto se multiplican, estas se diferencian e interpretan su posición para organizarse y formar al embrión con sus diferentes órganos. Como parte del proceso de diferenciación, las células se comprometen gradualmente en diferentes destinos celulares. Si la célula se encuentra en un estado de compromiso reversible se le denomina célula “especificada”. Por el contrario, si su estado de compromiso es irreversible se dice que es una célula “determinada”. Este estado de compromiso es dinámico en el tiempo y en espacio. De manera general, el proceso de diferenciación ocurre tanto en el desarrollo embrionario como en la fase posnatal, por lo tanto, este proceso es sumamente importante a lo largo de la vida de los organismos, ya que promueve cambios en el tamaño, la forma y en la respuesta que tienen las células a diferentes señales. A lo largo del desarrollo embrionario, las células interpretan señales que las llevan a organizarse en estructuras complejas y a adquirir una forma particular. Este proceso se denomina morfogénesis. La morfogénesis de un organismo está dirigida por diversos procesos celulares que incluyen proliferación, apoptosis, migración, adhesión y diferenciación celular¹. Es importante hacer notar que para en conjunto dar forma a un organismo, las células se arreglan de una manera particular en el espacio tridimensional; es decir, forman patrones. Los mecanismos que conllevan a la formación de patrones pueden ser “*cell autonomous*” (en donde no se requiere interacción celular), “inductivos” (en donde la interacción celular promueve cambios jerárquicos -estados- en las células) o mediante “mecanismos morfogenéticos” (en donde los cambios en la interacción celular no alteran el fenotipo celular sino la forma de una estructura particular)². Por lo tanto, el control de la diferenciación celular y la morfogénesis, así como su correcta interacción garantiza la formación y el funcionamiento normal de los organismos.

1.1 La extremidad embrionaria: un modelo para estudiar los procesos de morfogénesis y de diferenciación celular

El estudio del desarrollo de la extremidad permite entender los procesos de diferenciación, establecimiento de patrones y morfogénesis, por ello, ha sido utilizado como un modelo clásico en biología del desarrollo^{3,4}. En tiempos recientes, también el desarrollo de la extremidad ha sido utilizado como un modelo o paradigma de la regulación génica que incluye la comprensión desde la regulación de la cromatina hasta el estudio de sus malformaciones^{5,6}. Por esto, uno de los grandes retos en biología del desarrollo sigue siendo dilucidar cómo se forman las extremidades. Sería fascinante poder entender cómo es que un cúmulo de células indiferenciadas adquieren patrones espaciales bien definidos mientras mantienen una diferenciación y un crecimiento coordinado. La morfogénesis de las extremidades depende del comportamiento local de las células, es decir, de cómo interpretan en el tiempo y el espacio la variedad de señales que reciben, además de la modulación de la especificación del destino celular y la diferenciación. Por ello, el comprender la biología de las células que conforman a las extremidades en las etapas tempranas de su desarrollo es de gran importancia para entender cómo es que de manera diferencial interpretan y responden a dichas señales.

Con la acumulación de conocimiento que comenzó desde hace más de 100 años se han logrado descifrar algunos de los mecanismos celulares y moleculares que dictan el desarrollo de la extremidad. Sin embargo, de estas estructuras tan complejas falta aún mucho por descubrir.

1.1.1 La extremidad y su desarrollo

Los apéndices o extremidades en los vertebrados cumplen importantes funciones relacionadas con la locomoción, vuelo, nado, posicionamiento correcto y manipulación de objetos. De manera general, si se les observa, se puede apreciar que en los organismos existen claras diferencias morfológicas entre sus extremidades anteriores y posteriores pero que el patrón de los elementos esqueléticos que las conforman es compartido: un elemento esquelético proximal (estilópodo), que corresponde al húmero en las extremidades anteriores y al fémur en las posteriores; un par

de elementos esqueléticos en la parte media (zeugópodo), al que pertenecen el radio y la ulna en las extremidades anteriores y la tibia y fíbula en las posteriores; y, finalmente un número variable de elementos distales (autópodo) en donde se encuentran los carpos o tarsos para las extremidades anteriores y posteriores, respectivamente, además de los dígitos. Los tejidos y estructuras que conforman las extremidades están organizadas en tres ejes principales: el eje próximo distal (P-D) que va del hombro a la punta de los dedos, el eje anteroposterior (A-P) que va del dedo pulgar al dedo meñique y finalmente el eje dorsoventral (D-V) de los nudillos, uñas/garras a la planta/almohadillas⁷.

De manera general y por simplicidad, el desarrollo de la extremidad se ha dividido en cuatro etapas: 1) el establecimiento de la identidad de la extremidad y la formación del primordio; 2) el establecimiento de los patrones a través de la activación de los centros señalizadores; 3) la diferenciación comenzando con la condensación del mesénquima y la formación de condrocitos además de la morfogénesis; y 4) el crecimiento, segmentación, regulación de la identidad digital y la maduración de la extremidad⁸⁻¹⁰. El establecimiento de los ejes anatómicos y el proceso de formación de patrones se da en dos pasos: primero, las células adquieren información posicional y segundo, las células interpretan esta información para diferenciarse apropiadamente⁷. A su vez, existen dos modelos que proponen cómo se adquiere esta información posicional en el eje P-D de la extremidad: por un lado, el modelo de la zona de progreso que sugiere que en la parte distal del primordio las células obedecen a un modelo relacionado con el tiempo que permanecen bajo ciertas señales, es decir, adquieren información posicional diferencial conforme el desarrollo continúa, y por el otro, el modelo de especificación temprana o pre-especificación en donde se propone que las células del primordio de la extremidad poseen información posicional especificada desde etapas muy tempranas^{11,12}; sin embargo, ninguno de estos modelos ha sido totalmente demostrado. Las bases celulares y moleculares que conllevan a la formación, organización y posicionamiento de las regiones que conforman a la extremidad han sido investigadas en conjunto bajo la premisa de entender la relación que existe entre la evolución, el desarrollo y la morfogénesis de las extremidades. Gracias a estos esfuerzos, actualmente se han logrado desentrañar algunas cuestiones acerca de esta interrogante. Por ejemplo, se han identificado diferentes centros señalizadores y las bases moleculares de las interacciones entre

ellos que dirigen el crecimiento, diferenciación y morfogénesis de las extremidades. Estos tres centros señalizadores son: la zona de actividad polarizante (ZPA, por sus siglas en inglés), localizada en la parte anterior del primordio y que controla la formación del eje A-P; la cresta ectodérmica apical (AER, por sus siglas en inglés) la cual dirige la formación del eje P-D y el ectodermo no perteneciente a la AER que dirige la formación del eje D-V¹³.

El primer signo visible de la aparición de las extremidades es la formación de los primordios. Inicialmente, estas estructuras están formadas por células mesenquimales homogéneas histológicamente, indiferenciadas, recubiertas por una capa de ectodermo. Durante el desarrollo, el primordio se transforma de manera impresionante, convirtiendo a esta población celular homogénea en una serie de tejidos y estructuras ordenadas que finalmente formarán la extremidad madura. La inducción del primordio se inicia en zonas definidas a lo largo del eje rostro-caudal del embrión; a estas posiciones específicas se les conoce como 'campo de la extremidad'. El campo de la extremidad se especifica molecularmente en la etapa 13HH-14HH (HH, según Hamilton y Hamburger)¹⁴ en el embrión de pollo y en el día 9.5 post coito (dpc) en el embrión de ratón¹⁵. Después de la especificación del campo embrionario y de la adquisición de la identidad antero-posterior de las extremidades (lo cual sucede para la extremidad anterior entre las somitas 15-20 en el pollo y entre la 7-12 para el ratón y para la extremidad posterior en el pollo entre las somitas 26-32 y en el ratón entre la 23-28¹⁶), se lleva a cabo el fenómeno de transición epitelio-mesénquima y la proliferación de las células pertenecientes a la placa lateral del mesoderma que conlleva a la protrusión del primordio¹⁷. Las bases moleculares que favorecen la inducción del primordio de la extremidad se describieron en 1995, en donde se demostró que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es suficiente para iniciar la formación de la extremidad, ya que al aplicar una perla embebida con este factor en el flanco de un embrión de pollo o en la zona intermedia entre las extremidades, se induce una extremidad adicional completa^{18,19}. Trabajos posteriores demostraron que los factores Fgf10 y Fgf8 se expresan en el mesoderma intermedio y que interactúan a través del receptor de Fgf2 (FGFR2) para iniciar la formación del primordio de la extremidad²⁰⁻²³.

Subsecuente a la inducción del primordio, se forma la AER, la cual consiste en un epitelio especializado, engrosado, localizado en la parte más distal del primordio, el cual señala a las

células mesenquimales subyacentes para mantenerlas en un estado indiferenciado y proliferativo^{11,24}. En 1948, John Saunders demostró que al remover la AER de los primordios tempranos de las extremidades de pollo, las estructuras más distales de la extremidad se perdían de una manera etapa-dependiente, esto es, entre más temprano en el desarrollo se removía la AER, más severos eran los truncamientos resultantes^{25,26}. Ahora, se sabe que las moléculas de la AER encargadas de señalar hacia el mesénquima de la extremidad pertenecen a diversos miembros de la familia de FGF: Fgf4, Fgf2 y Fgf8²⁷⁻³⁰. Por otro lado, se sabe que Radical Fringe (r-Fng) se expresa en el ectodermo antes de la aparición de la AER y que determina su posición^{31,32}, sin embargo, la señal que induce la formación de esta estructura se desconoce. Ya establecido el primordio, se llevan a cabo los procesos de crecimiento, diferenciación y morfogénesis de las extremidades.

1.1.2 Establecimiento de los linajes celulares en la extremidad embrionaria

En la extremidad adulta podemos encontrar diversos tejidos: músculo, dermis, piel, vasos sanguíneos, nervios, melanocitos, tendones y ligamentos, cartílago y hueso. Se ha descrito que el cartílago, el hueso, la dermis y los ligamentos y tendones derivan propiamente del mesénquima del primordio³³⁻³⁶, mientras que los progenitores del músculo y los vasos sanguíneos migran a partir de otras estructuras del embrión hacia el primordio para allí terminar su diferenciación³⁶⁻³⁹. Después de la inducción del primordio, las células mesenquimales reciben e interpretan señales provenientes de los diferentes centros señalizadores lo cual las lleva a organizarse y diferenciarse en condrocitos (en el centro de la extremidad) y en tejido conectivo (en la periferia del primordio). Durante todo el proceso de desarrollo, se establecen interacciones célula-célula entre el mesénquima y el ectodermo lo cual resulta en un crecimiento coordinado y tridimensional de las estructuras de la extremidad. Inicialmente, las células mesenquimales subyacentes al ectodermo reciben señales de dos familias de proteínas -FGF y *Wingless/Integrated1* (WNT, por sus siglas en inglés)- las cuales interactúan de manera sinérgica para mantenerlas en un estado indiferenciado y proliferativo^{25,40}. El primer tejido en diferenciarse en el primordio de la extremidad es el cartílago. En su trabajo, Lorda-Diez *et. al.*, propone que la condrogénesis en la extremidad se divide en cuatro etapas: 1) el reclutamiento de las células precondrogénicas, 2) la condensación celular, 3)

el periodo pre-cartílago en donde ocurre la secreción de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) y 4) la diferenciación del cartílago⁴¹. La formación del cartílago es visualmente evidente en el centro del primordio con la condensación y el arreglo poliédrico de las células mesenquimales, empaquetándose de tal forma que prefigura los elementos esqueléticos⁴²⁻⁴⁴. Durante la condensación, las células mesenquimales secretan elementos de la ECM, por ejemplo, fibronectina, que reduce el espacio entre las células adyacentes incrementando su agregación y previniendo su dispersión^{41,45,46}. A partir de que las células se agregan, secretan constantemente colágena tipo II (*Col2a1*) y proteoglicanos. El estudio de la cascada molecular de la condrogénesis ha identificado al gen *SRY-Box 9 (Sox9)* como el principal factor que dirige la diferenciación a condrocitos, promoviendo la transcripción de diversos genes relacionados con el inicio de la condrogénesis entre ellos fibronectina y *Col2a1*^{34,41,47,48}. A la par del proceso de condrogénesis, en el borde entre el cartílago en formación y el mesénquima, las células cambian su morfología a células elongadas y forman el pericondrio. Posteriormente, los condrocitos proliferan de manera transitoria para salir del ciclo celular comenzando así un proceso denominado hipertrofia, en donde aumentan considerablemente de tamaño además de expresar grandes cantidades de colágena X (*Col10a1*)⁴⁹. Los condrocitos hipertróficos actúan como centro señalizador para eventualmente ser reemplazados por hueso siguiendo la vía de osificación endocondral⁵⁰. Los osteoblastos, los cuales se distinguen por expresar osteocalcina, se diferencian a partir de las células del pericondrio y forman el periosteo, proceso que inicia gracias a la señalización por la proteína Indian hedgehog (IHH) secretada por los condrocitos hipertróficos. Los osteoblastos, a su vez, secretan y depositan matriz mineralizada en el lugar que ocupaban los condrocitos hipertróficos. La invasión de los vasos sanguíneos al cartílago hipertrófico también se ha relacionado con la entrada de osteoclastos, cuya función es degradar la ECM para producir la cavidad de la médula ósea (MO) en etapas de desarrollo más avanzadas⁵¹⁻⁵⁴. Adicionalmente, se sabe que el gen *Runt-related transcription factor-2 (Runx2)* es una molécula clave en la regulación de la diferenciación de osteoblastos, inicialmente, es expresado en bajos niveles por el mesénquima condrogénico. Subsecuentemente, la expresión de *Runx2* se incrementa y se restringe al pericondrio y a los osteoblastos⁵⁵⁻⁵⁷. Anteriormente se consideraba que en las etapas finales de la osificación endocondral todos los condrocitos hipertróficos eran eliminados mediante

apoptosis y eran reemplazados directamente por matriz de hueso. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunos condrocitos hipertróficos son capaces de llevar a cabo transdiferenciación hacia osteoblastos^{49,58}.

La diferenciación de todos los linajes de la extremidad ocurre de manera orquestada, por lo tanto, existe un momento en el desarrollo en donde las células están respondiendo diferencialmente a todas las señales presentes y, al unísono, los diferentes linajes están siendo establecidos y regulados en la extremidad. Por lo tanto, en el momento en el que las células mesenquimales en el centro del primordio están diferenciándose a cartílago y hueso, otras a su alrededor están formando los tendones y ligamentos. A su vez, los progenitores de células musculares comienzan su migración del dermomiótomo de las somitas hacia el primordio de la extremidad en la etapa E10.5 en el ratón⁵⁹⁻⁶². Pevio a la migración de los progenitores musculares, la somita se especifica inicialmente en dos regiones: el esclerotomo y el dermomiótomo. El esclerotomo da origen a las vértebras y a las costillas mientras que del dermomiótomo se originan la futura dermis y los progenitores musculares^{63,64}. Sonic hedgehog (SHH), secretado por la notocorda induce la formación del esclerotomo mientras que la señalización por proteínas Wnt provenientes del tubo neural y del ectodermo dorsal especifican a las células del dermomiótomo. Los progenitores musculares para migrar necesitan realizar una transición epitelio mesénquima la cual está regulada por FGF provenientes del primordio de la extremidad. Los progenitores musculares se encuentran contenidos en el dermomiótomo de las somitas y para migrar a la extremidad comienzan a expresar, entre otros genes, *scattered factor*, *Paired-box 3 (Pax3)* y tirosin-cinasa Met (*c-met*), conocida también como factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), los cuales se ha demostrado que son necesarios para su correcta delaminación y migración⁶⁵⁻⁶⁷. En el momento en que comienzan a migrar, los progenitores musculares están especificados mas no determinados hacia ese linaje debido a la señalización inhibitoria de BMP4 proveniente de la placa lateral del mesodermo³⁷. La diferenciación hacia el linaje muscular depende de la expresión de los factores de transcripción MyoD, Mrf4 y Miogenina, los cuales se comenzarán a expresar de manera gradual conforme las células se diferencian en el primordio de la extremidad. En ese momento se puede decir que los progenitores musculares están determinados y terminarán su diferenciación formando fibras musculares^{68,69}.

Hasta este momento, se conoce muy bien de dónde provienen cada uno de los linajes celulares presentes en la extremidad, empero, no se conoce con certeza el estado de diferenciación inicial de las células mesenquimales que conforman el primordio en etapas tempranas. Se desconoce si corresponden a células progenitoras especificadas diferencialmente para cartílago, hueso y tendones o, si todos estos linajes que se originan del primordio provienen de un progenitor común comprometido, o si se trata de un progenitor común con un potencial de diferenciación más amplio que responde de manera diferencial a las distintas señales presentes en la extremidad inhibiéndose así su diferenciación hacia otros linajes.

Aunque morfológicamente se observa que las células mesenquimales del primordio son homogéneas en etapas tempranas, es poco probable que molecularmente correspondan a una sola población celular. Existen en la literatura algunos trabajos que sugieren de manera directa o indirecta la existencia de células progenitoras en el primordio con un amplio potencial de diferenciación. Por ejemplo, en el trabajo de Umansky, a partir del cultivo del mesénquima de la parte más distal del primordio de extremidades de embriones de ratón con 11 días de desarrollo, se determinó que la diferenciación a cartílago depende de la densidad celular; con mayor densidad celular se favorece la diferenciación hacia ese linaje⁷⁰. De manera interesante, en este trabajo se reporta también que, si las células provenientes de este tejido se cultivan durante cinco o seis días, además de formarse cartílago, se observan fibras musculares en los cultivos. Es importante resaltar del trabajo de Umansky que las células que se sembraron y evaluaron pertenecen al área indiferenciada del primordio. Así mismo, se sabe que en esa etapa en esa zona aún no están presentes los progenitores musculares que migran a la extremidad⁷¹. Entonces la pregunta que surge es: ¿el tejido muscular observado se formó a partir de las células mesenquimales del primordio? Por otro lado, en el trabajo de Chevallier y colaboradores que se realizó *in vivo*, en el cual el objetivo fue determinar la contribución de las somitas en la formación del tejido muscular, los autores irradiaron el mesodermo somítico adyacente al campo de la extremidad en embriones de pollo antes de la formación del primordio; observaron que 2/3 de los embriones irradiados no forman músculo, pero 1/3 de los embriones presentaron tejido muscular con o sin ningún defecto⁷². Entonces, ¿cómo es que se pudieron encontrar en estas extremidades tejidos que se supone no deberían formarse debido a que se destruyó el

mesodermo somítico del cual se sabe provienen sus progenitores?, ¿Es el mesénquima de la extremidad capaz de compensar esta deficiencia somítica debido a la presencia de algún progenitor multipotente? De manera interesante, en la discusión de este trabajo los autores mencionan que no tienen argumentos para decir que este tejido muscular no proviene del mesodermo del primordio, y que, de hecho, en unos ensayos preliminares, observaron que al trasplantar mesodermo de somatopleura de codorniz en tubo neural de pollo, en etapas en las que aún no han migrado las células somíticas, observaron también en estas extremidades ectópicas la presencia de músculo. Bajo estas condiciones, la somatopleura parece ser capaz de compensar la deficiencia somítica. Pese a esto, la conclusión de este trabajo es que debido a que en 2/3 de los casos no se formó musculatura, se confirma que el mesodermo somítico es requerido para la formación del músculo en la extremidad. En un trabajo más reciente, Pearse y colaboradores realizaron un análisis clonal *in vivo* en la extremidad embrionaria de pollo utilizando una biblioteca de vectores lentivirales marcados con fosfatasa alcalina. Determinaron la relación clonal de las células fosfatasa alcalina positivas e identificaron los tejidos en donde se integraron estas células. Al analizar las tres etapas de desarrollo inyectadas con los lentivirus (16HH, 18HH y 20HH), encontraron que algunas clonas originaban desde dos hasta cinco linajes diferentes entre cartílago, tendón, pericondrio, músculo y dermis. Fue en el caso de la inyección en etapa 16HH que observaron dos clonas que se diferenciaron a cartílago, tendón, pericondrio, músculo y dermis. Los autores concluyeron que entre más avanzado en el desarrollo evaluaban la diferenciación había menos número de clonas multilíneaje. Adicionalmente, observaron que el tamaño de la clona (es decir, el número de células descendientes de cada célula infectada) disminuía conforme avanzaba el desarrollo. Con este trabajo se plantea la existencia de poblaciones celulares multipotentes en el primordio de la extremidad, sin embargo, no se descarta la posibilidad de la existencia de subpoblaciones celulares con un potencial más o menos restringido⁷³. La estrategia que utilizaron los autores de este trabajo sin duda permitió identificar clonas celulares *in vivo* y los linajes a los que estas se diferencian, sin embargo, el estudio a fondo de estas células está limitado debido a la falta de marcadores específicos para identificar a estas poblaciones. Finalmente, en un trabajo publicado en el 2012, se encontró que las células de la extremidad embrionaria de humanos pueden diferenciarse *in vitro* a adipocitos, osteocitos, células

tipo neurona y hepatocitos; linajes que pertenecen a las tres capas germinales. Además, encontraron que estas células expresan diversos marcadores asociados a células mesenquimales estromales multipotentes (MSC), antes denominadas células troncales mesenquimales⁷⁴. La limitante de este estudio es que se realizó con células de extremidades de un solo embrión de humano con 6 semanas de gestación, lo cual corresponde a la etapa 16/17 según la clasificación de Carnegie, siendo su equivalente 12.5-13 días de gestación en el ratón. La principal crítica es que, en esta etapa, los elementos esqueléticos ya están desarrollados y la zona de células indiferenciadas en la extremidad es muy pequeña. Además, el hecho de que haya sido utilizado únicamente un solo embrión a partir del cual se obtuvieron las células obligó a su cultivo y expansión.

Este último trabajo demuestra que en la extremidad embrionaria se expresan marcadores de MSC, lo cual abre la posibilidad de utilizarlo para aislar sistemáticamente diferentes poblaciones celulares del primordio de la extremidad cuando este se encuentre en etapas tempranas del desarrollo y caracterizarlas.

Entre los 10 y 11 días de gestación del ratón, las células del primordio de la extremidad son morfológicamente homogéneas, además se observan pocos espacios vasculares con células hemáticas^{36,46}. Además, de que en esta etapa del desarrollo es más probable encontrar células indiferenciadas o en un estado temprano de diferenciación. Es por ello por lo que los primordios en etapa 10.5 (E10.5) son una buena opción para identificar poblaciones de células mesenquimales que expresen marcadores asociados a las MSC, aislarlas y determinar así su estado de diferenciación.

1.2 Células mesenquimales estromales multipotentes (MSC): una herramienta para el estudio de subpoblaciones en el primordio de la extremidad

Las células mesenquimales estromales multipotentes (MSC) se han definido como una población celular que tiene la capacidad de diferenciarse hacia distintos linajes incluyendo osteocitos, adipocitos y condrocitos^{75,76}. Cabe destacar que estos linajes son los mismos que están presentes en la extremidad adulta. Además de la diferenciación multilínea, las MSC comparten características con las células del mesénquima de la extremidad: son adherentes, provienen de tejidos de origen mesodérmico y presentan una alta proliferación celular.

Las MSC fueron identificadas por vez primera por Friedenstein y colaboradores en 1970 a partir de células adherentes de médula ósea⁷⁷. En sus inicios, estas células se denominaron Células Troncales Mesenquimales; sin embargo, se ha establecido que una célula troncal se define por la capacidad que tiene de autorrenovarse (generar progenie con sus mismas características indefinidamente *in vitro* y/o permanecer por largos periodos de tiempo en el organismo *in vivo*) y por la capacidad de diferenciarse al menos hacia un linaje celular⁷⁸⁻⁸¹. Hasta este momento, en la literatura no se ha reportado algún trabajo que demuestre la capacidad de autorrenovación de las MSC. Por esta razón su nombre derivó en células mesenquimales estromales multipotentes, el cual toma en consideración la propuesta de su lugar de origen en los tejidos adultos, el estroma. Recientemente, Arnold Caplan propuso utilizar el nombre de *Medicinal Signaling* debido a las demostraciones de que la función *in vivo* de las MSC en tejidos adultos es inmunomoduladora y señalizadora al llegar a los tejidos dañados y promover su regeneración⁸². Sin embargo, más allá de la falta de demostración de troncalidad en estas células, su potencial de diferenciación *in vitro* e *in vivo* ha sido bien definido y bien podría tratarse de células progenitoras o de amplificación transitoria⁸³. Debido su gran capacidad de diferenciación recientemente se ha incrementado su estudio por su potencial aplicación terapéutica.

El método con el cual las MSC se aíslan de diversos tejidos adultos, embrionarios y extraembrionarios consiste principalmente en realizar una selección de células adherentes mediante cultivos *in vitro*. Posteriormente, las células adherentes se caracterizan inmunofenotípicamente mediante ensayos con citometría flujo y finalmente se determina el potencial de diferenciación *in vitro* y/o *in vivo* de las células obtenidas^{84,85}. Existen algunas

variaciones y adaptaciones a este método de obtención, por ejemplo, comenzar los cultivos adherentes a partir de una selección previa con diversos marcadores o, en vez de realizar marcajes individuales para determinar el inmunofenotipo de las células se realizan marcajes múltiples para encontrar y caracterizar subpoblaciones⁸⁶⁻⁸⁹. En todos los casos, la intención de realizar cultivos es expandir las poblaciones de células presentes en los tejidos. Aunque se ha logrado el aislamiento de estas células a partir de distintos tejidos, la principal fuente de MSC sigue siendo la médula ósea. Estudios *in vitro* han demostrado que las MSC son capaces de diferenciarse incluso a otros linajes que no son mesodérmicos como tejido neuronal⁹⁰. No obstante, la existencia de una gran cantidad de estudios sobre el aislamiento de MSC, no existía un criterio universalmente aceptado para definir las MSC. En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular definió tres criterios que deben cumplir las MSC: adherencia a plástico bajo condiciones de cultivo estándar; expresar los marcadores de superficie ($\geq 95\%$) CD105, CD73 y CD90, y carecer de la expresión ($\leq 2\%$) de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR, los cuales son marcadores del linaje hematopoyético; y por último, deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteocitos, adipocitos y condrocitos⁷⁶. Cabe resaltar que estos criterios se establecieron para células humanas y aunque las características de adherencia y diferenciación son compartidas con otras especies, no todos los antígenos de superficie expresados se comparten. La mayoría de los estudios de marcadores de superficie realizados tanto en humanos como en modelos murinos han sido realizados en células obtenidas de médula ósea, pero algunos se han realizado en otros órganos, encontrándose variaciones entre poblaciones e incluso entre células aisladas de diferentes fuentes como tejido adiposo, piel, timo, riñón, pulpa dental y placenta⁹¹⁻⁹⁶. Por esta razón y debido a que en este trabajo se utilizó el modelo de ratón para la elección de los marcadores de MSC evaluados, se tomó en cuenta un estudio comparativo de la expresión de marcadores de superficie en diferentes tejidos de modelos murinos, el cual reporta que los marcadores encontrados que se expresan con mayor frecuencia son CD29, CD44 y Sca1 y, por el contrario, las células MSC en modelos murinos siempre son negativas a los marcadores CD45 y CD117⁹⁷. En el caso de la expresión de los marcadores CD90, CD73 y CD105 hay discrepancias en la literatura ya que dependiendo del tejido en que se evalúe las células pueden ser positivas o negativas o, simplemente, estos marcadores no han sido evaluados al considerarse de humano⁹⁷. En este

trabajo consideramos que es de importancia determinar su expresión en el primordio de la extremidad.

La función de los marcadores asociados a MSC en estas células no ha sido totalmente establecida. Se sabe, sin embargo, que en la extremidad embrionaria CD29 (integrina $\beta 1$) participa en la interacción de los condrocitos con la matriz extracelular previniendo la apoptosis y promoviendo la proliferación; como componente del sistema mecanotransductor y en la regulación de la orientación del huso mitótico de los condrocitos para su organización y plano de división⁹⁸⁻¹⁰⁰. La expresión de CD44 (receptor de hialuronato) se ha asociado con el proceso de condensación del mesénquima, además, se ha demostrado que este receptor colocaliza con Fgf8 y es necesario para el crecimiento y desarrollo de la extremidad¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Por su parte, a CD105 se le ha atribuido un papel importante en la angiogénesis y se sabe que es co-receptor de TGF- β , aunque se desconoce su función en la extremidad¹⁰⁵. En el caso de CD73 (ecto-5' nucleotidasa), su expresión se ha visto claramente en algunos tipos de linfocitos y células endoteliales estando implicado en la activación de linfocitos, su proliferación y adhesión al endotelio; sin embargo, su papel en otros tipos celulares no es claro¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Por su parte, la expresión de CD90 se ha identificado en linfocitos y también en tejidos no linfoides como fibroblastos, células cerebrales y células endoteliales activadas¹⁰⁹, se sabe que promueve la liberación de factores de crecimiento y citocinas para ayudar en la reparación de tejidos además de tener un papel en la adhesión célula-matriz y célula-célula así como en la migración hacia sitios de inflamación¹¹⁰. La función que se le ha atribuido en las MSC está relacionada con la regulación de la diferenciación, ya que la inhibición de su expresión incrementa la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica en diversos tejidos¹¹¹. Finalmente, Sca1 (*stem cell antigen 1*, por sus siglas en inglés) es una proteína glicosil-fosfatidil inositol propia de modelos murinos, que se localiza en balsas lipídicas en la membrana celular. A pesar de que no se ha identificado aún su ligando, es el marcador más común utilizado en combinación con otros para enriquecer células troncales hematopoyéticas murinas (*HSC*, por sus siglas en inglés). Se cree que la interacción con su ligando media la adhesión celular y señala para mantener la homeostasis de las HSC ya que su presencia genera más complejos señalizadores y resulta en el aumento de la población de progenitores o de HSC^{112,113}. Está

reportado, además, que la sobreexpresión de *Sca1* en MO de humano y ratón elimina el linaje mielóide, lo que plantea la posibilidad de la existencia de un homólogo en humano, lo cual no ha sido esclarecido hasta ahora¹¹⁴. De manera interesante, en el ratón nulo para el gen *Sca1* (*Sca1*^{-/-} null mice) el desarrollo del esqueleto es normal, pero los ratones adultos en edades avanzadas desarrollan osteoporosis¹¹⁵. En este trabajo, los autores proponen que *Sca1* tiene un papel importante en la autorrenovación de las células MSC de la médula ósea además de la diferenciación hacia osteoclastos¹¹⁵.

La identificación de los mecanismos moleculares que controlan la especificación del destino de las células indiferenciadas, así como la identidad de estas células es relevante para comprender de manera completa el proceso de diferenciación de los tejidos presentes en la extremidad embrionaria. Debido a las características que presentan las MSC, es factible la utilización de los marcadores de superficie que las definen para identificar y aislar subpoblaciones celulares en la extremidad embrionaria. Esta aproximación permitirá un aislamiento continuo de las poblaciones celulares y su caracterización.

II. Planteamiento del problema y justificación

Muchos estudios referentes al desarrollo de la extremidad se han enfocado en tratar de elucidar cuáles son las señales que dirigen la inducción, el crecimiento, la morfogénesis e incluso la identidad de las extremidades. Sin embargo, no se ha demostrado el estado inicial de diferenciación de las células que reciben estas señales. Por ello, para entender de manera integral cómo es que la extremidad, una estructura tan compleja, se desarrolla y se organiza de manera coordinada, así como los mecanismos por los cuales se especifican los diferentes destinos celulares, es necesario conocer antes el estado de diferenciación de las células que reciben las señales que controlan la diferenciación celular hacia los distintos linajes presentes en la extremidad.

III. Hipótesis

En la extremidad embrionaria existe una subpoblación de células mesenquimales que expresan marcadores asociados a MSC, la cual representa células en un estado temprano de diferenciación.

IV. Objetivos

General

El objetivo general de este trabajo fue identificar si en la extremidad embrionaria existen subpoblaciones de células mesenquimales que expresen marcadores asociados a células mesenquimales estromales multipotentes (MSC) y determinar su estado de diferenciación en comparación con las células totales de la extremidad embrionaria de ratón E10.5.

Particulares

1. Realizar un análisis comparativo entre el método habitual (por adherencia) y método directo para determinar el procedimiento más conveniente de obtención y caracterización de MSC en extremidades embrionarias de ratón.
2. Determinar la localización de los marcadores asociados a MSC: CD29, Sca1, CD44, CD105, CD90, CD73 en primordios de extremidades en diferentes etapas de desarrollo.
3. Aislar y caracterizar las subpoblaciones de células mesenquimales del primordio de la extremidad con base en la localización de los marcadores asociados a MSC.
4. Determinar la capacidad de diferenciación *in vitro* hacia diferentes linajes presentes en la extremidad de la o las subpoblaciones de células mesenquimales presentes en el primordio de la extremidad.
5. Determinar la capacidad de diferenciación *in vivo* y la capacidad morfogenética de las células de las subpoblaciones del primordio de la extremidad.

V. Materiales y Métodos

Aislamiento y obtención de las células del primordio de la extremidad

Para la realización de todos los experimentos se utilizaron las extremidades posteriores de embriones de ratón de la cepa CD1 con 10.5 días de gestación. Las hembras gestantes fueron obtenidas de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las hembras gestantes se sacrificaron individualmente mediante asfixia con CO₂. Posteriormente, los embriones fueron removidos del útero bajo condiciones asépticas y colocados en un amortiguador fosfato salino (PBS 1X, anexo 1) en donde se les retiraron completamente las membranas que los rodean. Después de retirar las membranas, los embriones se transfirieron a una caja de petri limpia y estéril con solución de PBS 1X. Los primordios de ambas extremidades posteriores fueron removidos de cada embrión con la ayuda de pinzas de disección, se colectaron en un tubo con la ayuda de una pipeta y se trataron con 2mg/mL de colagenasa tipo IV (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluida en solución de Hank's (anexo 1) durante 6 minutos. Al finalizar la digestión, se retiró la mayor cantidad posible de colagenasa y con la ayuda de una pipeta las células se disgregaron en 1 ml de medio DMEM-HG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB, Life Technologies), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin (Sigma-Aldrich), 1X de aminoácidos no esenciales (Life Technologies) y 1X de GlutaMAX (Life Technologies). Después de centrifugar y descartar el sobrenadante: 1) para los ensayos de citometría, el pellet de células se incubó durante 5 minutos en amortiguador de lisis AKC (ver anexo 1) y se resuspendieron en el amortiguador FACS (ver anexo1), 2) para la realización de los ensayos *in vitro* el pellet se resuspendió en medio DMEM-HG suplementado con SFB y se sembraron a concentraciones conocidas, 3) para las extremidades recombinantes (ER) las células se dejaron incubar en medio DMEM-HG suplementado con 10% de SFB durante 2 h, 4) para realizar la extracción de RNA, el pellet celular se resuspendió en Trizol Reagent (Life Technologies).

Ensayos de citometría de flujo

Para la realización de los ensayos de citometría de flujo, se resuspendieron 1×10^6 de células del primordio de la extremidad por cada 100 μL de amortiguador FACS. Para las tinciones individuales, las células se incubaron en tubos separados con cada uno de los siguientes anticuerpos: CD29-APC, Sca1-PE/Cy7, CD73-PE, CD44-PE, CD105-APC, CD45-PerCP, CD117-APC/Cy7 (Biolegend) y CD90-FITC (Abcam, San Francisco, CA, USA). Para más detalles de los anticuerpos utilizados consultar el anexo 2. Para las tinciones múltiples, las células se resuspendieron en amortiguador FACS y en el mismo tubo se añadieron juntos los anticuerpos CD29-APC, Sca1-PE/Cy7, CD45-PerCP y CD117-APC/Cy7 (Biolegend), Flk1-PE (BD Biosciences, San José, CA, USA) y CD44-FITC (Biogems, Westlake Village, CA, USA), (ver el anexo 2). La incubación con los anticuerpos para ambas condiciones se realizó durante 30 minutos en hielo, resuspendiendo cada 15 minutos y protegida de la luz. Transcurrido el tiempo, las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se lavaron una vez con 500 μL de PBS 1X. Al finalizar el lavado, las células se resuspendieron en 500 μL de amortiguador FACS por cada millón y se conservaron en hielo y en la oscuridad hasta el momento de la adquisición en el citómetro FACS Aria II (BD Biosciences).

Un tubo con células sin teñir y otro con la tinción realizada con los isotipos correspondientes a cada anticuerpo primario utilizado (ver anexo 2) se emplearon como control en cada ensayo para excluir la fluorescencia inespecífica. Como control de compensación para la tinción múltiple se utilizó la señal positiva del receptor de fibronectina CD49e-biotinilado (Biolegend) con cada uno de los fluorocromos utilizados para los ensayos descritos anteriormente (ver el anexo 2).

La adquisición y separación de las células se realizó en el citómetro FACS Aria II (BD Biosciences) del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo. Cada experimento se realizó por triplicado y cada uno representa un pool de aproximadamente 200 primordios. Al menos 20,000 eventos fueron colectados y analizados utilizando el software FlowJo versión 8.8.6.

Inmunofluorescencias

Obtención e inclusión de las muestras

Embriones de ratón de 10, 10.5, 11.5 y 12.5 días post coito fueron obtenidos de hembras CD1 gestantes. Después de retirarles las membranas y las vísceras en PBS 1X, los embriones se cortaron de manera transversal a la altura del abdomen, lo más cercano posible a las extremidades posteriores y se fijaron durante 24 h en paraformaldehído (PFA) al 4% (anexo 1) a 4°C. Transcurrido el tiempo, los embriones se lavaron con PBS 1X y se pasaron por un gradiente de sacarosa (JT Baker, cat-407201) diluida en PBS1X a una concentración del 10, 20 y 30% durante 12 h cada uno. Al finalizar, las muestras se incluyeron en el medio de montaje Tissue Tek (Sakura Finetek, USA) y se congelaron utilizando hielo seco. Se realizaron cortes seriados transversales de 26µ y se recuperaron en laminillas tratadas con gelatina al 5% (anexo 1). Previo a su almacenamiento a 4°C, las laminillas se incubaron durante 2 h en una cámara de vacío.

Inmunodetección

Las laminillas se lavaron tres veces con PBS 1X para retirar el exceso de Tissue Tek. La posible autofluorescencia se eliminó del tejido con una solución de sulfato de cobre 1mM preparada en acetato de amonio pH=5 (anexo 1). El tejido se permeabilizó con PBS-tritón 0.1% (PBT) durante 15 minutos y posteriormente se realizó la recuperación del antígeno a 65°C con inmuno/DNAretriever (Bio SB, Santa Bárbara, CA). Las muestras de tejido se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, anti-Sca1/Ly6A, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD45 (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-CD73 (Abcam) anti-CD44-PE, anti-CD117-APC/Cy7 o anti-CD29 (Biolegend). Para detalles específicos de los anticuerpos utilizados ver el anexo 2. Después de la incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X y, dependiendo de la especie en la que está hecho el anticuerpo primario utilizado, las muestras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario que reconociera al anticuerpo primario para detectar así la señal obtenida. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron α -cabra-Alexa 488, α -conejo-Alexa 647

y α -oveja-Alexa 555 (Life Technologies) (para más detalles ver el anexo 2); todos los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:250 μ L en PBS 1X. Los núcleos celulares se evidenciaron con DAPI a una dilución 1:500 μ L en PBS.

Las imágenes obtenidas se capturaron en el microscopio vertical Olympus BX51-WI equipado con fluorescencia y una unidad de disco giratorio (Olympus Corporation, Tokio, Japón).

Cultivo celular

Las células provenientes directamente de los primordios de extremidades, de tejido del tronco o de cabezas de embriones de 10.5 dpc se sembraron a una densidad de 5×10^4 células / cm^2 en medio DMEM-LG (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomycin, 1X de aminoácidos no esenciales y 1X de GlutaMAX y se cultivaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 h. En este punto las células se consideraron pase 0 (P0). Posteriormente, para realizar los pases las células se lavaron con PBS y se les añadió 1ml de tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma-Aldrich). La fracción adherente se recuperó y se resembró subsecuentemente para obtener los diferentes pases (pase 1 a pase 3; P1-P3). Después de que las células alcanzaran un 80-90% de confluencia en cada condición se recuperaron por tripsinización y se resuspendieron en 100 μ L de amortiguador FACS por cada millón y se tiñeron con los anticuerpos correspondientes para cada ensayo de citometría, o bien se dejaron en la placa de cultivo y se les añadió medio de diferenciación para realizar la diferenciación *in vitro*. Para los experimentos de densidad se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, pero la densidad inicial a la que se sembraron las células varió entre 1, 2.5, 4 o 5×10^4 células por cm^2 .

PCR en tiempo real

Células obtenidas inmediatamente después de ser disgregadas de los primordios, provenientes de diferentes pases, electroporadas con el plásmido Sca1-GFP o inmediatamente después de su separación por citometría de flujo se resuspendieron en Trizol Reagent (Life Technologies). La obtención del RNA total se realizó siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante. Al finalizar la extracción, el RNA fue tratado con 5U de DNAsa I (Promega, Madison, WI, USA) para

eliminar cualquier residuo de DNA genómico. Obtenido el RNA, se verificó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) al 1% y se realizó la retrotranscripción a partir de 2 µg de RNA con la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega). La expresión de mRNA se cuantificó utilizando el reactivo SYBR Green (Life Technologies) tomando como valor relativo al gen *Gapdh* de acuerdo a la ecuación $2^{-(ddCt)}$ o $2^{-(dCt)}$. La especificidad de los amplicones se verificó mediante curvas de disociación. Cada valor en las gráficas representa tres experimentos independientes bajo las mismas condiciones. Los oligonucleótidos para amplificar cada gen fueron diseñados con base en su secuencia publicada (Anexo 3) y todos los productos se amplificaron a una TM de 60°C.

Ensayos de diferenciación in vitro

Diferenciación osteogénica y cuantificación de alizarina roja

Las células de los primordios recién aisladas después de su separación por citometría de flujo o provenientes de cultivos celulares a diferentes pases se sembraron a una densidad de 30 y 50x10⁴ células/cm² respectivamente con medio DMEM-LG suplementado con 10% de SFB. Se permitió que las células alcanzaran 80-90% de confluencia y se indujo la diferenciación osteogénica con Complete MesenCult Osteogenic Medium (StemCell Technologies, Canada Inc, CA) durante 15 días. El medio fue reemplazado por medio fresco cada tercer día. Al finalizar, los cultivos se lavaron con PBS 1X y se fijaron con PFA al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se tiñeron durante 20 minutos con Alizarina Roja al 0.2% (anexo 1) y se lavaron con agua destilada. Como control, células totales del primordio de la extremidad fueron utilizadas, a las cuales se les sustituyó el medio de diferenciación osteogénica por medio DMEM-HG suplementado con 10% de SFB y se sometieron al mismo procedimiento que las células en diferenciación. La cuantificación del colorante Alizarina Roja se realizó de acuerdo a Kang et al. 2007¹¹⁶; después de la tinción, las células de cada condición se lavaron con agua destilada, se incubaron con ácido acético al 10% v/v a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación. La solución se transfirió a un tubo y fue calentada a 85°C durante 10 minutos. Posteriormente, la solución se incubó en hielo por 5 minutos seguido de una centrifugación a 20,000 g por 15

minutos. La reacción se neutralizó añadiendo hidróxido de amonio al 10% v/v y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek).

Diferenciación condrogénica: ensayo de micromasas.

Células totales de primordios de extremidad, células provenientes de diferentes pases, células pertenecientes a las subpoblaciones Sca1⁺ y Sca1⁻ o células totales transfectadas con el plásmido Sca1-GFP, se sembraron a una densidad de 2×10^5 células en una gota de 10 μ l de medio DMEM-HG adicionado con SFB al 10%. Una gota de células se colocó por pozo en placas de 48 pozos. Posteriormente, se permitió que las células se adhirieran durante 2 h y transcurrido el tiempo a cada pozo se le añadieron 300 μ L de medio DMEM-HG. El medio se reemplazó cada 24 h durante 3 días. Al tercer día de cultivo, a las micromasas se les añadió fijador de Khale (Anexo 1) durante 20 minutos y se tiñeron con azul alciano al 0.5% durante 12 h. Trascurrido el tiempo, los cultivos se lavaron dos veces con HCl 0.1N y una vez con PBS 1X durante 5 minutos cada lavado.

Diferenciación adipogénica

Células totales o células provenientes de diferentes pases se sembraron a una densidad de 5×10^4 células por cm^2 en medio DMEM-HG suplementado con 10% de SFB hasta que alcanzaron una confluencia de 80-90%. Se les añadió Complete MesenCult Adipogenic Medium (StemCell Technologies) el cual fue reemplazado cada 3-4 días durante 15 días. Posteriormente, las células diferenciadas se fijaron con formaldehído al 10% durante 30 minutos a 4°C y se tiñeron con Rojo Oleoso (Sigma-Aldrich) durante 2 h.

Las fotografías de todos los ensayos de diferenciación *in vitro* se tomaron en un microscopio óptico marca Olympus 1X50-S8F2 utilizando los objetivos de 10X y 20X.

Transfección del plásmido Sca1-GFP

Después de obtener las células totales de los primordios de extremidades posteriores de embriones de ratón E10.5, 5×10^6 células se resuspendieron en 400 μ L del amortiguador de electroporación *Multiporator Electroporation Buffer Isosmolar* (Eppendorf) y se transfectaron

mediante electroporación con 1.5 µg del plásmido Sca1-GFP (OriGene, MG200790, anexo 5) por cada millón. Las condiciones de electroporación utilizadas fueron las siguientes: 4 pulsos a 260V con una duración de 15 microsegundos cada uno, con un intervalo de 50 milisegundos entre cada pulso utilizando el electroporador Eppendorf Multiporator System. Posterior a la electroporación, las células se resuspendieron en medio DMEM-HG suplementado con SFB al 10% a una concentración de 200,000 células por cada 10 µL para la realización de los diversos ensayos con micromasas o bien, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 1,600 rpm durante 5 minutos con medio DMEM-HG suplementado con SFB al 10% y se dejaron incubar durante 1.5 h para promover la formación de un pellet y posteriormente con estas células rellenar ectodermos para realizar la extremidades recombinantes.

Hibridaciones in situ (HIS)

En cultivos de micromasas

Las micromasas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 4 h a temperatura ambiente. Para permeabilizar el tejido, se trataron dependiendo de la sonda a evaluar con 2 o 10 µg/ml de proteinasa K (Promega) (ver el anexo 4) durante 5 minutos a 20°C. Las muestras se hibridaron a 65°C durante toda la noche con sondas acopladas a digoxigenina específicas para cada transcrito evaluado (Anexo 4). La hibridación de la sonda se evidenció mediante una reacción colorimétrica utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) acoplado a fosfatasa alcalina.

Las fotografías de todos los ensayos de diferenciación *in vitro* se tomaron en un microscopio óptico marca Olympus 1X50-S8F2 utilizando los objetivos de 10X y 20X.

En extremidades recombinantes

Las extremidades recombinantes se obtuvieron posterior a 5 o 6 días de desarrollo en el embrión de pollo receptor y se lavaron una vez en PBS 1X. Posteriormente, se fijaron con PFA al 4% durante toda la noche a 4°C y se deshidrataron en un tren ascendente de metanol diluido en PBT (25, 50, 75 y 100%) durante 5 minutos cada concentración. En estas condiciones el tejido se almacenó hasta su uso a una temperatura de -20°C. Al momento de comenzar la HIS, el tejido se rehidrató

siguiendo el tren inverso de deshidratación, las muestras se lavaron tres veces con PBT y se permeabilizaron con proteinasa K a diferentes concentraciones dependiendo de la sonda utilizada (anexo 4). La hibridación se realizó con sondas acopladas a digoxigenina específicas para cada gen evaluado y se evidenció mediante una reacción colorimétrica utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) acoplado a fosfatasa alcalina.

Todas las muestras se fotografiaron en el microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 acoplado a una cámara AxioCam MSc Zeiss utilizando el programa AxioVision 4.3 (Carl Zeiss Vision).

Ensayos de diferenciación y morfogénesis *in vivo*: extremidades recombinantes (ER)

Esta técnica consiste en rellenar un ectodermo de primordio de extremidad de un embrión de pollo donador con células mesenquimales disgregadas provenientes de otro primordio de extremidad de pollo, o en este caso de ratón, e implantarlo *in ovo* en un embrión de pollo receptor y permitir su desarrollo para posteriormente evaluar el fenotipo obtenido.

Para realizar estos ensayos, primero se separaron las extremidades anteriores y posteriores de embriones de pollo en etapa 22HH y se trataron durante 30 minutos con tripsina al 0.5% en PBS 1X. Posteriormente, con la ayuda de pinzas se obtuvieron los ectodermos correspondientes a cada primordio en una solución de PBS 1X adicionada con 10% de SFB para inactivar la tripsina. Por otro lado, células totales de primordios posteriores de extremidad o las células transfectadas con el plásmido Sca1-GFP se centrifugaron con medio DMEM-HG y se dejaron incubar durante 1.5 hr a manera de que se formara un pellet. Transcurrido este tiempo, el pellet de células se sacó del tubo y se transfirió a una caja con PBS 1X suplementado con 10% de SFB. Allí, se rellenaron los ectodermos de pollo obtenidos anteriormente y fueron implantados con la ayuda de un par de alambres de paladio en la parte dorsal a la altura del campo de la extremidad anterior de embriones de pollo receptores en etapa 22-23HH. Las ER se dejaron desarrollar durante 5 o 6 días y se tiñeron con la técnica de tinción de esqueleto, se deshidrataron para posteriormente realizarles HIS o bien se incluyeron en parafina para realizarles cortes histológicos.

Inclusión de muestras en parafina, cortes histológicos y tinción con hematoxilina y eosina

Los embriones que presentaban ER se lavaron dos veces con PBS 1X y posteriormente se les disecó la ER. Las muestras se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 5% a temperatura ambiente durante 24 h y tiñeron con azul alciano al 1% durante 24 h. Transcurrido el tiempo se lavaron con HCl 0.1N 2 veces durante 30 minutos y se deshidrataron con etanol durante 2 h y con dos cambios de Xilol 100% de 10 minutos cada uno. En este punto las muestras se fotografiaron y posteriormente se incluyeron en parafina precalentada a 60°C (Paraplast embedding media, Sigma-Aldrich). Al solidificarse la parafina a temperatura ambiente, las muestras se guardaron a 4°C por al menos 2 días. Se realizaron cortes longitudinales seriados de las ER. Los cortes se colocaron en laminillas tratadas previamente Tessa 4% (3-aminopropyl-triethoxysilano, Sigma-Aldrich) y se dejaron en la plancha de estiramiento (Leica HI 1220) toda la noche a 42°C. Las laminillas se guardaron a -20°C hasta su uso. Para realizar la tinción de hematoxilina y eosina, las muestras se rehidrataron en un tren descendente de xilol-etanol hasta llegar a agua bidestilada. Se tiñeron durante 9 minutos con Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) y 3 minutos con eosina (Sigma-Aldrich). Después de ser teñidas, las laminillas se deshidrataron nuevamente con un tren ascendente de etanol hasta llegar a Xilol.

Tinción de esqueleto de extremidades recombinantes (ER)

Para evidenciar la formación de cartílago en las extremidades recombinantes se realizó la tinción con azul alciano de la siguiente manera: posterior a obtener el tejido de los embriones que formaron ER, se lavó dos veces con PBS 1X y se fijó durante 24hr en 5% de ácido tricloroacético (TCA) a temperatura ambiente. Se tiñó durante las 24 h posteriores con azul alciano al 1% diluido en etanol al 70% e inmediatamente después se deshidrató con etanol al 100% durante 24 h más. Finalmente, el tejido se aclaró con metilsalicilato hasta que los elementos esqueléticos fueran evidentes.

VI. RESULTADOS

6.1 Análisis comparativo de las estrategias de obtención de MSC en las células del primordio de la extremidad embrionaria: la importancia de la caracterización directa

La extremidad embrionaria en etapas tempranas está formada por células mesenquimales indiferenciadas que durante el desarrollo originan los diversos tejidos presentes en la extremidad adulta. Sin embargo, el estado de diferenciación en el que se encuentran las células mesenquimales del primordio en el momento en que comienzan a recibir señales de diferenciación se desconoce. Debido a que las MSC se asemejan morfológicamente y en su capacidad de diferenciación con las células mesenquimales de la extremidad embrionaria, se determinó la expresión de marcadores de MSC en una etapa temprana del primordio de la extremidad, específicamente E10.5. Está claro que las MSC han sido identificadas y caracterizadas a partir de cultivos primarios de diversos tejidos, sin embargo, la intención de este trabajo fue identificar subpoblaciones de células en el primordio que expresaran marcadores de MSC y determinar su estado de diferenciación, esto, realizado en un contexto cercano a la extremidad. Por tales motivos, se realizó un análisis comparativo previo evaluando las características de expresión de genes, diferenciación celular y expresión de marcadores de MSC utilizando dos métodos: el método clásico de obtención de MSC, es decir, partiendo de cultivos adherentes y, por otro lado, se realizó la caracterización en las células recién aisladas del primordio de la extremidad.

Los resultados de esta sección fueron publicados en la revista *Cell Biology International* bajo el título: "A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture"¹¹⁷ (ver el anexo 6).

6.1.1 Un bajo porcentaje de células recién aisladas de la extremidad embrionaria de ratón expresan marcadores asociados a MSC

Mediante ensayos de citometría de flujo con marcaje individual se evaluó el porcentaje de células positivas a las proteínas transmembranales CD29, Sca1, CD44, CD105, CD90 y CD73, las cuales se utilizan como marcadores de MSC y se encuentran con mayor frecuencia en diferentes tejidos de modelos murinos. Esta determinación se realizó en las células recién aisladas (no cultivadas) del primordio de extremidades posteriores E105. Los resultados de esta determinación evidenciaron que el marcador CD29, que corresponde a la integrina $\beta 1$, se expresa en la mayoría de las células del primordio ($93.9 \pm 4.7\%$) mientras que para todos los demás marcadores evaluados el porcentaje de células positivas no rebasa el 2.5% del total de las células (Figura 1). Para la determinación se utilizaron como control para excluir la señal inespecífica células totales sin teñir (sin ningún anticuerpo) y células teñidas con el isotipo de cada anticuerpo utilizado. El bajo porcentaje de expresión de marcadores de MSC encontrado en el primordio de la extremidad correlaciona con la poca cantidad de células progenitoras y células troncales que se ha demostrado existen en diversos tejidos.

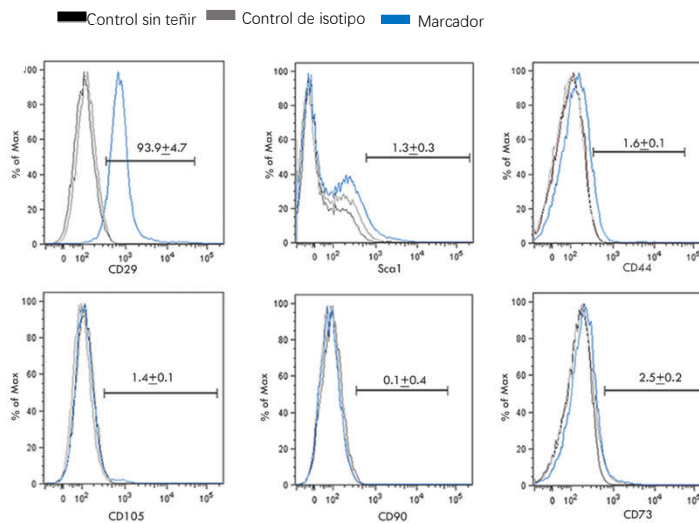


Figura 1 Los marcadores asociados a MSC se expresan en un bajo porcentaje de células recién aisladas de los primordios de extremidades E10.5.

Histogramas obtenidos a partir de citometría de flujo que muestran el porcentaje de expresión de los marcadores asociados a MSC: CD29, Sca1, CD44, Cd105, CD90 y CD73 en células provenientes de primordios de extremidad totales sin cultivar. Los datos corresponden al porcentaje expresado como (promedio \pm SD).

6.1.2 Las células no cultivadas del primordio expresan niveles bajos de genes asociados a la diferenciación de distintos linajes propios de la extremidad.

Con la intención de conocer los niveles basales de expresión de genes tempranos y tardíos asociados a la diferenciación hacia distintos linajes presentes en la extremidad, se evaluaron mediante qRT-PCR los niveles de expresión de los genes *Runx2*, *Col10a1*, *Opn* (linaje osteogénico), *Sox9*, *Col2a1* (linaje condrogénico), *Scx*, *Col1a1* (linaje tenogénico), *Pprg* y *Adpn* (linaje adipogénico) en las células recién aisladas del primordio E10.5. Los resultados obtenidos mostraron que en esta etapa de desarrollo las células del primordio expresan niveles muy bajos de todos los genes de diferenciación evaluados, siendo *Col10a1* el gen con los mayores niveles de expresión (0.15) (Figura 2). Estos resultados confirman que en esta etapa de desarrollo el primordio de la extremidad está conformado principalmente por células indiferenciadas, a pesar de que la mayoría no expresan marcadores de MSC.

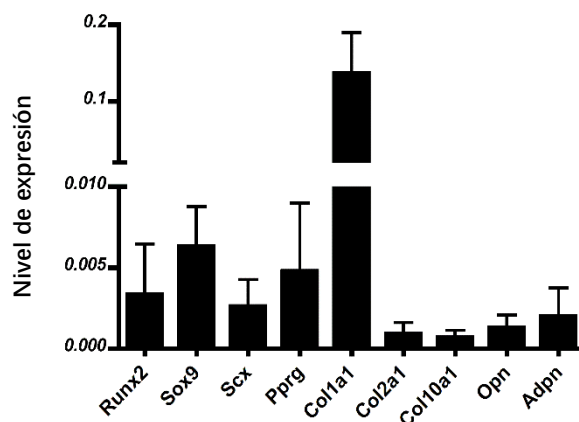


Figura 2 Las células recién aisladas de los primordios de extremidades E10.5 expresan niveles bajos de genes de diferenciación osteo-, condro-, teno- y adipogénica

Niveles de expresión evaluados mediante qRT-PCR de genes tempranos y tardíos de diferenciación hacia los linajes osteogénico (*Runx2*, *Opn*), condrogénico (*Sox9*, *Col2a1*), tenogénico (*Scx*, *Col1a1*) y adipogénico (*Pprg*, *Adpn*). Los valores mostrados se normalizaron con base en la expresión de el gen *Gapdh*. Cada dato mostrado representa tres experimentos independientes.

6.1.3 Después de ser cultivadas, las células provenientes de los primordios de la extremidad embrionaria adquieren los marcadores Sca1 y CD44.

Para determinar si la expresión de marcadores asociados a MSC cambia de acuerdo con método de obtención, las células totales obtenidas de los primordios de extremidad se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/cm² y se evaluó el porcentaje de células positivas a los marcadores CD29, Sca1, CD44, CD105, CD90 y CD73 en tres diferentes pases celulares. La primera condición fue pase 0 (P0), la cual correspondió a 24 h de cultivo; las células de pase 1 (P1) y pase 3 (P3) correspondieron a células resembradas subsecuentemente una o tres veces a partir de las células P0. Los resultados mostraron que con únicamente 24 h de cultivo (células P0), el número de células positivas al marcador Sca1 incrementó 65 veces (84.8 ± 8.0) y para el marcador CD44 se incrementó 56 veces (90.2 ± 0.3) con respecto a las células recién aisladas (Tabla 1). Además, se observó que el alto porcentaje de expresión de los marcadores Sca1 y CD44 se mantuvo a través de los diferentes pases celulares evaluados. Por otro lado, la expresión del marcador CD29 se vio disminuida desde el P0 hasta el P3, mientras que el porcentaje de células positivas a los marcadores CD105, CD90 y CD73 disminuyó en el P0 incrementándose a partir del P3 (Tabla 1). Estos resultados dejan claro que el número de células que expresan algunos de los marcadores asociados a MSC está relacionado con la forma en que las células son obtenidas.

Tabla 1 Comparación del porcentaje de expresión de marcadores asociados a MSC en células sin cultivar y células cultivadas a diferentes pases del primordio de la extremidad. El promedio de los datos se muestra expresado como (promedio \pm SD).

	Sca1	CD44	CD29	CD105	CD90	CD73
Recién aisladas	1.3 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1	93.9 \pm 4.7	1.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.04	2.5 \pm 0.2
P0	84.8 \pm 8.0	90.2 \pm 0.3	65.9 \pm 13.9	0.7 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.4
P1	87 \pm 6.4	64.9 \pm 19.3	61.3 \pm 9.3	0.26 \pm 0.04	1.02 \pm 0.3	1.01 \pm 0.09
P3	78.4 \pm 8.6	67.8 \pm 24.7	62.4 \pm 25.9	4.8 \pm 0.22	6.6 \pm 1.8	6.2 \pm 4.6

6.1.4 El incremento en el número de células positivas a Sca1 y CD44 observado en las células del primordio después de ser cultivadas no se debe a la expansión de una población de células Sca1⁺ y CD44⁺, sino a una adquisición *in vitro*.

Debido a que el incremento en el número de células positivas a los marcadores Sca1 y CD44 observado después del cultivo pudo deberse a un aumento en la proliferación celular que conllevara a la expansión específica de las células Sca1 y CD44 positivas, se planteó un experimento en el cual se permitiera que las células sembradas llevaran a cabo un diferente número de divisiones para alcanzar una confluencia de 80-90% en cultivo. Esto se realizó sembrando las células de los primordios a diferentes densidades iniciales. Una vez que las células alcanzaron un 80-90% de confluencia, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células positivas a los marcadores Sca1 y CD44. Estos resultados mostraron que el porcentaje de células positivas al marcador Sca1 se mantiene en niveles muy altos independientemente de la densidad inicial de cultivo (Tabla 2). Por otro lado, la expresión de CD44 varía de 55 a 60% cuando las células son sembradas a densidades bajas (1 y 2.5×10^4 células/cm²) en comparación con la densidad celular más alta (5×10^4 células/cm²) en donde alcanza el 71% de células positivas (Tabla 2).

Tabla 2 Comparación del porcentaje de expresión de los marcadores Sca1 y CD44 en células de primordios cultivadas durante 24h a diferentes densidades iniciales. El promedio de los datos se muestra expresado en porcentaje como (promedio \pm SD).

	Sca1	CD44
1×10^4 células/cm²	90.2 \pm 2.9	59.6 \pm 8.3
2.5×10^4 células/cm²	95.2 \pm 3.2	55.3 \pm 2.0
4×10^4 células/cm²	88.6 \pm 4.2	71.1 \pm 3.1

Otra posibilidad que podría explicar el aumento en la expresión de los marcadores Sca1 y CD44 observado en las células después de ser cultivadas es que hubiera una subpoblación celular que coexpresara ambos marcadores, que esta se adhiriera mayoritariamente a la caja de cultivo y que posteriormente ocurriera una expansión selectiva de esta subpoblación. Sin embargo, al evaluar el porcentaje de las células del primordio que coexpresan los marcadores Sca1 y CD44 (la subpoblación Sca⁺/CD44⁺) antes de ser cultivadas, se encontró que esta subpoblación representa al 0.64% de las células totales (Figura 3). Por lo cual, resulta poco probable la posibilidad de que menos del 1% de las células totales que se siembran se adhiera y que posteriormente esta población se expanda. Aunado a esto, cabe mencionar que en los cultivos no se observó en ningún caso una gran cantidad de células muertas o no adheridas dentro de las 24 h después de haber sembradas (datos no mostrados).

Estos resultados en conjunto sugieren que el alto porcentaje de células positivas a Sca1 y CD44 observado después del cultivo desde tiempos cortos se debe a una adquisición *in vitro* más que a la expansión o selección específica *per se* de las células Sca1 y CD44 positivas que se encuentran en el primordio de la extremidad.

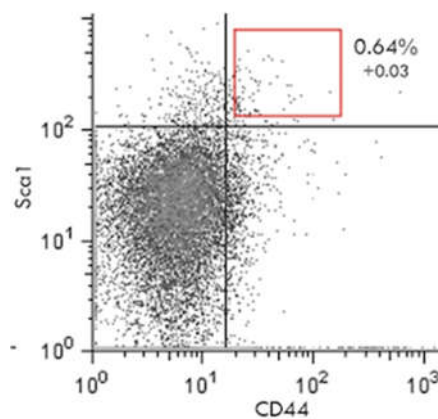


Figura 3 El porcentaje de células recién aisladas de los primordios que coexpresa los marcadores Sca1 y CD44 es muy bajo.

Dot plot obtenido mediante citometría de flujo que muestra el porcentaje de células de la subpoblación Sca1⁺/CD44⁺ antes de ser cultivadas. El valor del porcentaje obtenido está expresado como promedio ± SD y representa tres experimentos independientes.

6.1.5 La capacidad de diferenciación *in vitro* hacia los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico de las células del primordio de la extremidad se modifica después del cultivo.

Tras observar que las células del primordio adquieren marcadores asociados a MSC después de ser cultivadas, surgió la pregunta de si el simple cultivo de las células también cambiaría su comportamiento al ser inducidas a diferenciarse *in vitro* hacia distintos linajes. Para explorar esta posibilidad, se comparó la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células recién aisladas y de los P0, P1 y P3 hacia los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico; linajes relacionados directamente con las células MSC. Los ensayos de micromasas, los cuales reflejan la capacidad de diferenciación celular hacia condrocitos, mostraron que el potencial de diferenciación hacia este linaje decreció en las células provenientes de los P0, P1 y P3 respecto a las células recién aisladas (Figura 4). En cuanto a la diferenciación osteogénica, también se observó un cambio en el potencial de diferenciación hacia este linaje de las células de los P0, P1 y P3, en donde la diferenciación de las células en estos pases se vio incrementada en comparación con las células recién aisladas. Por otra parte, se observó que la capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico es reducida tanto en las células recién aisladas como en las sembradas a diferentes pases. Sin embargo, en las células del pase 3 se notó un ligero aumento en la cantidad de células positivas a rojo oleoso, lo cual refleja que bajo estas condiciones la capacidad de las células para responder a los estímulos de diferenciación adipogénica se incrementa.

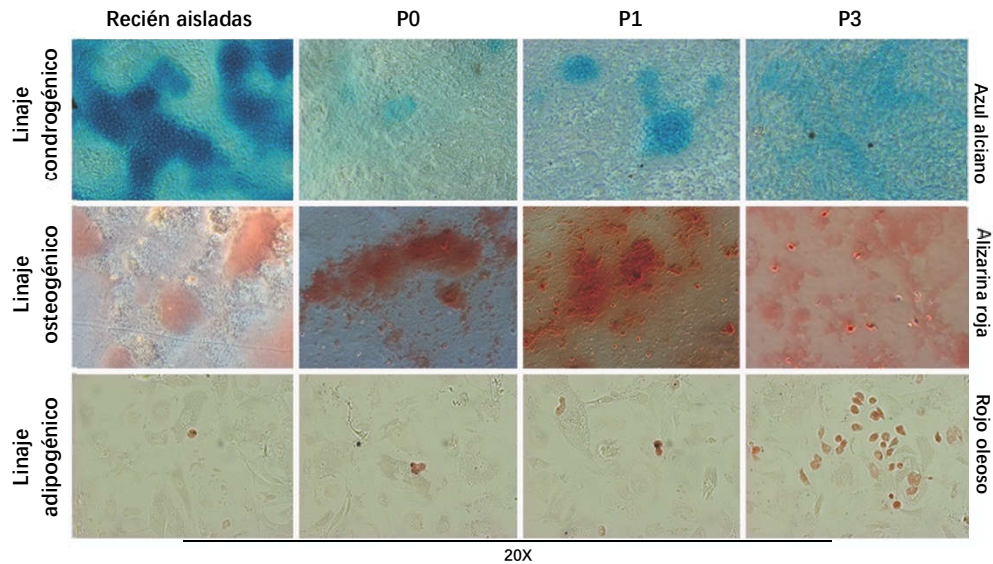


Figura 4 La capacidad de diferenciación *in vitro* de las células de los primordios se modifica después del cultivo.

Imágenes representativas de la diferenciación *in vitro* de células recién aisladas y cultivadas provenientes de diferentes pases (P0, P1 y P3). Para evidenciar la diferenciación, las células se tiñeron con azul alciano para el linaje condrogénico, alizarina roja para el linaje osteogénico y rojo oleoso para el linaje adipogénico. Cada fotografía es representativa de tres experimentos independientes.

Para evidenciar el aumento en las deposiciones de calcio observadas en los diferentes pases celulares, se cuantificó la cantidad de alizarina roja presente en las células diferenciadas al linaje osteogénico. La cuantificación mostró un aumento en la tinción de una manera pase-dependiente. Entre mayor es el tiempo de cultivo, mayor es la capacidad de respuesta a la inducción hacia la diferenciación osteogénica (Figura 5). Con este ensayo, quedó confirmado que el cultivo de las células de los primordios de extremidades modifica su capacidad de diferenciación *in vitro*.

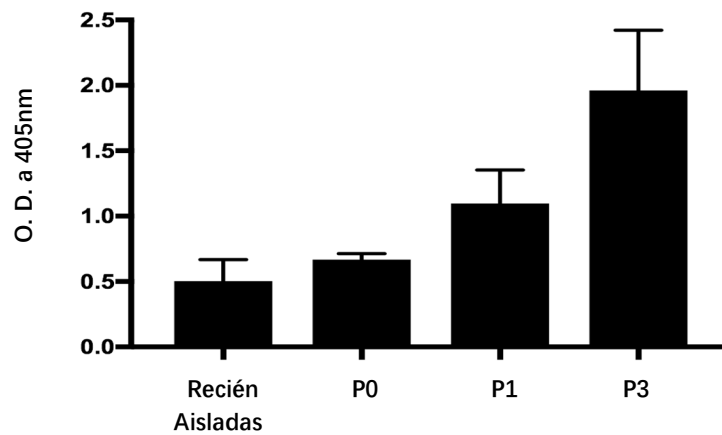


Figura 5 La cantidad de deposiciones de calcio en las células diferenciadas de los primordios está relacionada con el pase en el que se encuentren.

Cuantificación del colorante alizarina roja en células recién aisladas y células del pase 0 (P0), pase 1 (P1) y pase 3 (P3) después haber sido inducidas a diferenciarse hacia el linaje osteogénico. La cuantificación se realizó determinando la densidad óptica (O.D. del colorante). Cada valor representa tres experimentos independientes.

Con la intención de conocer si la modificación en capacidad de diferenciación osteogénica prevalece después de un número mayor de pases a los ya evaluados, se estudió la capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico en células del pase 5 (P5), pase 7 (P7) y pase 8 (P8). El resultado obtenido mostró que no existe una variación considerable en el potencial osteogénico de estas células a partir del quinto pase celular (Figura 6), sin embargo, sí se mantiene una mayor capacidad de diferenciación de las células en estos pases celulares comparado con lo obtenido en células recién aisladas (Figura 4 y 6).

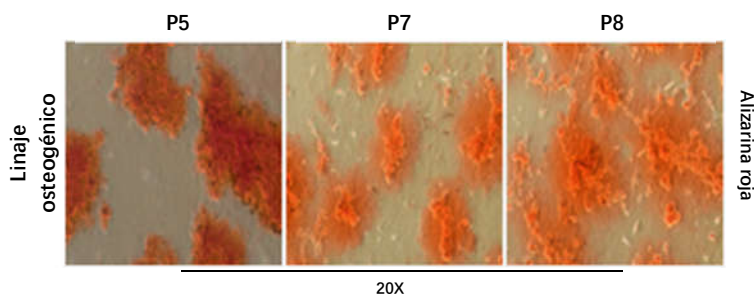


Figura 6 La capacidad de diferenciación osteogénica in vitro de las células del primordio se mantiene a partir del pase 5.

Imágenes representativas de experimentos de diferenciación provenientes de células de primordios pase (P5), pase 7 (P7) y pase 8 (P8) teñidas con alizarina roja. Cada imagen es representativa de tres experimentos independientes.

6.1.6 Evaluación del perfil de expresión de genes relacionados con diferenciación en células del primordio de la extremidad después de ser cultivadas.

Debido a que el cultivo de las células del primordio de la extremidad promueve la adquisición de los marcadores Sca1 y CD44, además de influir en la capacidad de respuesta de las células a la inducción con diferentes medios de diferenciación, es probable que la expresión de genes maestros que dirigen la diferenciación celular se estén también modificando. Para evaluar esta posibilidad, se compararon mediante qRT-PCR los perfiles de expresión de genes de diferenciación temprana y tardía en células de los P0, P1 y P3 con el perfil de expresión obtenido en células no cultivadas. Bajo condiciones basales de cultivo, es decir, sin ningún tipo de medio de diferenciación, se observó una variación en la expresión de los genes tempranos de diferenciación dependiendo del pase evaluado (Figura 7). La expresión del gen *Runx2*, se indujo en todas las condiciones de cultivo. Por el contrario, en el gen *Pprg* se observó una disminución en su expresión a partir del P0, la cual se mantuvo a lo largo de todos los pases. Por otro lado, el gen *Sox9*, se indujo ligeramente en el P0 y disminuyó a partir del P1 al P3, mientras que *Scx*, disminuyó en las dos primeras condiciones de cultivo y solo se observó aumentado en el P3 (Figura 7). En el caso de los genes asociados a la diferenciación tardía, también se observó una dinámica en su expresión respecto al pase evaluado. Por un lado, los genes *Col1a1*, *Col10a1* y *Opn* aumentaron considerablemente en todos los pases. La expresión del gen de *Col2a1*

disminuyó considerablemente desde el P0 al P1, sin embargo, en el P3 se observó que la expresión aumentó sin llegar a ser mayor que en las células sin cultivar. Finalmente, el gen tardío de diferenciación adipogénica, *Adpn*, aumentó en el P0 mientras que su expresión disminuyó en el P1 al P3 (Figura 7). Estos resultados confirman que el cultivo de las células del primordio de la extremidad embrionaria favorece también cambios en el perfil de expresión de genes que dirigen la diferenciación, lo cual se relaciona con la capacidad de respuesta de las células a los estímulos de diferenciación al momento de ser cultivadas, esto respecto a las células obtenidas de manera directa.

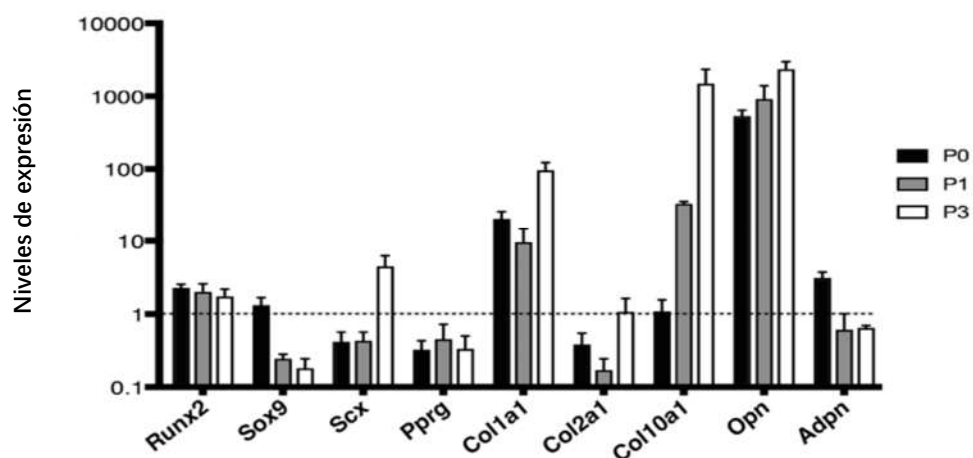


Figura 7 El cultivo de las células del primordio modifica el perfil de expresión de genes relacionados con diferenciación celular.

Determinación por qRT-PCR de la expresión de genes tempranos y tardíos de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico en células de primordios provenientes de diferentes pases celulares (P0, P1 y P3). Los valores fueron normalizados con los datos obtenidos para cada gen en las células sin cultivar (línea punteada). Cada valor representa tres experimentos independientes.

6.1.7 Las células provenientes de tejidos embrionarios distintos al primordio de la extremidad tienen la misma tendencia de adquisición de los marcadores Sca1 y CD44 después de ser cultivados.

Debido a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se decidió determinar si el fenómeno observado de adquisición de los marcadores Sca1 y CD44 después del cultivo sucede también en células de otros tejidos embrionarios. Para llevar a cabo este experimento se eligieron dos tejidos distintos al primordio de la extremidad: uno que estuviera enriquecido con células mesenquimales y el otro por un tipo celular distinto. Células del tronco o de cabezas de embriones de ratón en etapa E10.5, se disgregaron utilizando el mismo procedimiento utilizado para los primordios e inmediatamente después de ser obtenidas se determinó el porcentaje de células positivas a los marcadores Sca1 y CD44. Posteriormente, las células totales de cada uno de los tejidos se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/cm² y cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia (aproximadamente después de 24 h, lo cual corresponde al P0), nuevamente se determinó el porcentaje de células positivas para cada marcador. El resultado obtenido mostró que las células recién aisladas de ambos tejidos expresan niveles más bajos de los marcadores Sca1 y CD44 que las células cultivadas. Para el marcador Sca1 el porcentaje pasó de ser del 3.4% al 43.6% en las células de la cabeza y del 1.2% al 52.6% en las células del tronco. Por otro lado, el marcador CD44 de expresarse en el 2.5% se incrementó al 38.2% en las células de las cabezas mientras que aumentó del 2.4% al 35.1% en las células provenientes de tronco (Tabla 3). Es interesante notar que hubo un mayor cambio en la expresión del marcador Sca1 después del cultivo en las células enriquecidas en tejido mesenquimal (tronco) comparado con células provenientes de la cabeza.

Tabla 3 Comparación del porcentaje de expresión de los marcadores Sca1 y CD44 en células totales provenientes de cabezas y troncos de embriones E105 antes y después de ser cultivadas. Los datos se muestran como promedio \pm SD.

	Sca1		CD44	
	Recién aisladas	P0	Recién aisladas	P0
Cabezas	3.4 \pm 1.2	43.6 \pm 6.3	2.5 \pm 0.4	38.2 \pm 8.7
Troncos	1.2 \pm 0.4	52.6 \pm 11	2.4 \pm 0.2	35.1 \pm 9.3

Con base en los resultados obtenidos referentes a la comparación entre estrategias de obtención de MSC y las características de las células, se puede concluir que para identificar la presencia de poblaciones celulares en el primordio de la extremidad que expresen marcadores asociados a MSC sin modificarlas de manera significativa y evidenciar así sus características, conviene utilizar la estrategia de obtención y caracterización sin realizar de manera previa ningún tipo de cultivo.

6.2 Caracterización de subpoblaciones de células mesenquimales multipotentes en la extremidad embrionaria de ratón

Hasta este momento, los resultados obtenidos demostraron que la estrategia más conveniente para conocer las propiedades intrínsecas de las células mesenquimales del primordio de la extremidad es aislarlas de manera directa y posteriormente caracterizarlas, esto debido a que el cultivo previo a su caracterización modifica considerablemente, además de su perfil inmunofenotípico, su capacidad de diferenciación *in vitro* y su perfil de expresión génica relacionado con la capacidad de diferenciación celular. Por ello, se siguió la estrategia de caracterización directa para garantizar que los resultados obtenidos fueran más apegados a lo que sucede en el contexto celular de la extremidad embrionaria.

6.2.1 Los marcadores asociados a MSC expresados en las células del primordio de la extremidad E10.5 no necesariamente corresponden a células mesenquimales *in situ*.

El hecho de que en la extremidad embrionaria exista un porcentaje de células positivas a diversos marcadores de MSC, es importante porque es posible que estas pocas células pudieran tratarse de una población celular multipotente. Adicionalmente, es factible también que en el primordio existan subpoblaciones celulares con diferentes potenciales de diferenciación, que pudieran ser identificadas utilizando diferentes combinaciones de los marcadores de MSC encontrados. Por ello, después de conocer del porcentaje de células positivas a los diferentes marcadores asociados a MSC en la extremidad embrionaria (Figura 1), el siguiente paso fue conocer si estos marcadores corresponden verdaderamente a células mesenquimales o son expresados por otro tipo celular en el primordio. Para ello, se determinó mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica la localización de las células positivas a los marcadores CD29, Sca1, CD44, CD105, CD90 y CD73. En la Figura 8A se observa un corte transversal a la altura de las extremidades posteriores de un embrión de ratón E10.5, en donde se muestran las estructuras y los ejes de referencia para determinar la localización de los marcadores evaluados. A pesar de que ha sido reportado que estos marcadores se encuentran en células mesenquimales, nuestros resultados mostraron que *in situ* en la etapa E10.5, únicamente los marcadores CD29 y Sca1 se localizaron en el tejido

correspondiente al mesénquima del primordio (Figura 8B). Por un lado, el marcador CD44 se localizó en la AER, mientras que CD105 se observó claramente en las células endoteliales del primordio. Por otro lado, el marcador CD73 se localizó en el ectodermo dorsal del primordio de la extremidad. En el caso del marcador CD90, con esta técnica no fue detectada ninguna célula positiva (Figura 8B).

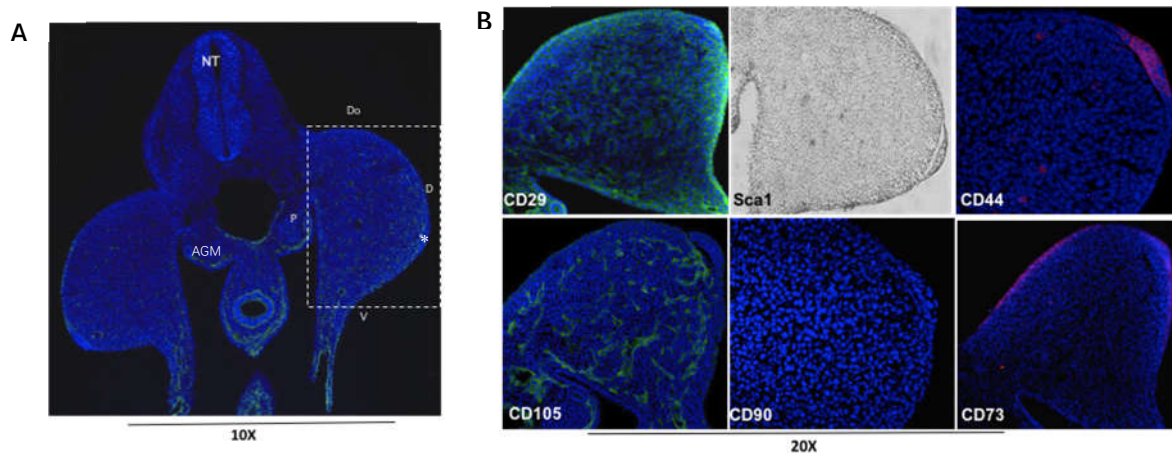


Figura 8 Los marcadores asociados a MSC se expresan en diversos tejidos del primordio de la extremidad y no únicamente en el mesénquima.

A. Corte transversal de un embrión de ratón E10.5 a la altura de las extremidades posteriores en donde se señala su orientación y los tejidos que lo conforman. Dentro del recuadro se muestra la localización de uno de los dos primordios de extremidad. **B.** Imágenes representativas de la inmunodetección de los marcadores CD29 (verde) , Sca1 (negro), CD44 (rojo), CD105 (verde), CD90 (rojo) y CD73 (rojo) en cortes transversales de primordios de extremidades posteriores E10.5. En todos los casos los núcleos se muestran teñidos en color azul con DAPI. NT= tubo neural, AGM= aorta-gónada-mesonefros, Do= dorsal, V= ventral, P=proximal, D= distal, el asterisco muestra la localización de la AER.

Debido a que se ha reportado que el marcador Sca1 se expresa también en células troncales y células progenitoras hematopoyéticas, se determinó el porcentaje y la localización de los marcadores de células hematopoyéticas CD45 y CD117 en el primordio, con el fin de asegurar que las células Sca-positivas observadas correspondieran a células mesenquimales del primordio y no a células del linaje hematopoyético. Los resultados mostraron que el porcentaje de células positivas para ambos marcadores evaluado mediante citometría de flujo en las células del primordio fue del 0.47% del total de las células (Figura 9). Por otro lado, la inmunodetección para

determinar la localización de las células positivas a ambos marcadores en el primordio mostró que para el marcador CD117 las células se localizan en la parte proximal del primordio y en la zona denominada aorta-gónada-mesonefros (Figura 9, panel superior). Por el contrario, no se detectó ninguna célula CD45-positiva mediante inmunofluorescencia en los primordios de extremidad (Figura 9, panel inferior).

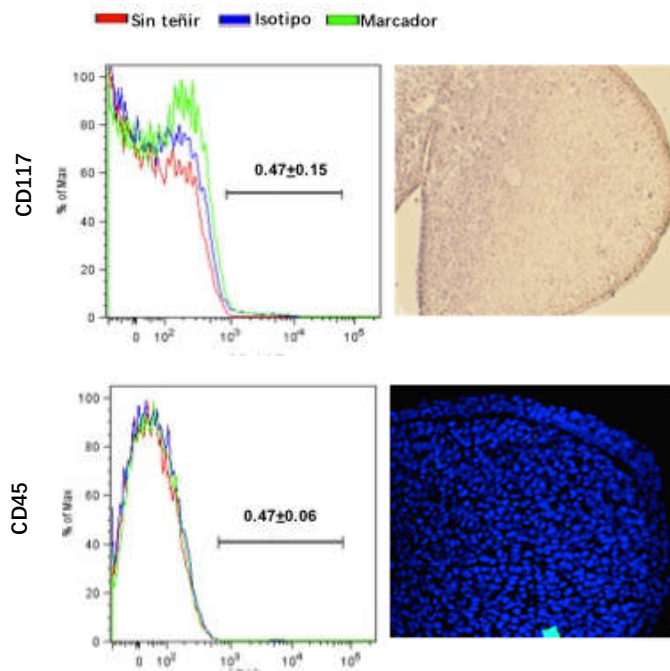


Figura 9 En el primordio de la extremidad muy pocas células expresan marcadores de células hematopoyéticas.

Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas a los marcadores CD45 y CD117 en células recién aisladas de primordios de extremidad. Los datos se muestran como promedio \pm SD. Los cortes transversales de los primordios de extremidad de ratón E10.5 muestran la localización de los marcadores CD45 (panel superior) y CD117 (morado, panel inferior).

6.2.2 Identificación de dos subpoblaciones de células mesenquimales en la extremidad embrionaria.

Con base en los resultados que muestran que únicamente los marcadores CD29 y Sca1 se encuentran localizados en el mesénquima del primordio de la extremidad, se decidió caracterizar a dos subpoblaciones de células mesenquimales en la extremidad embrionaria. Para ello, como selección positiva se utilizaron los marcadores CD29 y Sca1, así mismo, para realizar la selección negativa de otros tipos celulares se utilizaron el marcador CD44 para el ectodermo distal y los marcadores CD45 y CD117 para eliminar a las células hematopoyéticas. En el caso de selección negativa de las células del endotelio, se utilizó el marcador Flk1 (por sus siglas en inglés, *fetal liver kinase-1*, el cual es un receptor del factor de crecimiento vascular endotelial) en sustitución de CD105 debido a la combinación requerida de fluorocromos para realizar el ensayo multiparamétrico de citometría de flujo. Previo a su sustitución, se verificó que las células CD105 y Flk1 positivas colocalizaran en el primordio de la extremidad como se muestra en la figura 10.

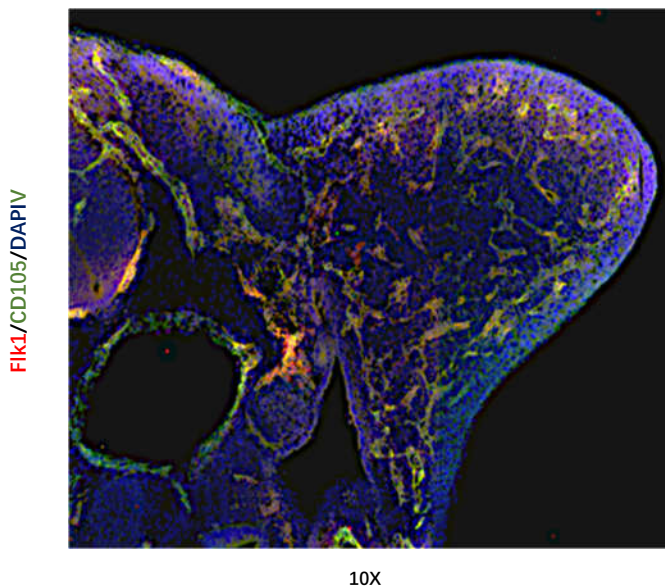


Figura 10 Colocalización de las células CD105 y Flk1 positivas en el primordio de la extremidad.

Immunofluorescencia en donde se muestra la colocalización de los marcadores CD105 y Flk1 en un corte transversal de un embrión de ratón E10.5. La marca para las células positivas a Flk1 se observa en rojo y para CD105 en verde. Las células doble positivas se observan en amarillo. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Esta imagen representa tres experimentos independientes.

Los resultados de la identificación de las subpoblaciones mesenquimales del primordio de la extremidad mostraron que el $1.86 \pm 0.4\%$ de las células coexpresan los marcadores mesenquimales Sca1 y CD29 siendo a su vez negativas para CD44, Flk1, CD45 y CD117 (Figura 11). A esta subpoblación celular se le denominó $sSca^+$. Por otro lado, el $63.5 \pm 3.8\%$ de las células del primordio corresponde a las células CD29 positivas que a su vez son negativas para los marcadores Sca1, CD44, Flk1, CD45 y CD117; a esta última subpoblación se le denominó $sSca^-$ (Figura 11). Debido a la selección multiparamétrica utilizada, se asegura que ambas subpoblaciones pertenecen específicamente a células mesenquimales del primordio de la extremidad.

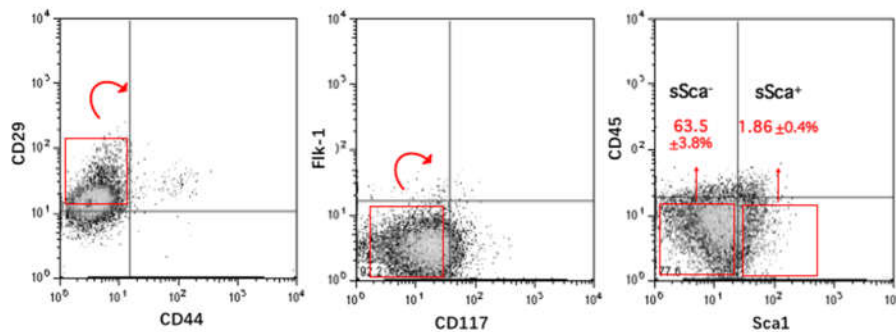


Figura 11 En el primordio de la extremidad existen dos subpoblaciones de células mesenquimales que difieren en la expresión del marcador Sca1.

Dot plots obtenidos a partir de un marcaje múltiple utilizando los marcadores CD29, CD44, Flk1, CD117, CD45 y CD117 en donde las flechas muestran la jerarquía seguida para la identificación de dos subpoblaciones en la extremidad embrionaria. Subpoblación Sca-negativo ($sSca^-$): Sca^- , $CD29^+$, $CD44^+$, $Flk1^+$, $CD117^+$, $CD45^+$; subpoblación Sca-positivo ($sSca^+$): Sca^+ , $CD29^+$, $CD44^+$, $Flk1^+$, $CD117^+$, $CD45^+$. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm SD de seis experimentos independientes.

6.2.3 Las subpoblaciones sSca⁺ y sSca⁻ se distinguen en su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia linajes propios de la extremidad

Para determinar la diferencia entre las subpoblaciones respecto a su capacidad de diferenciación *in vitro*, ambas se separaron mediante citometría de flujo y posteriormente se sembraron en monocapa a una densidad de 30,000 células/cm². Una vez adheridas, se les indujo a diferenciarse *in vitro* con un medio específico de diferenciación osteogénica. O bien, se sembraron a una densidad de 200,000 células en 10uL de medio para realizar un cultivo de micromasas para inducir su diferenciación condrogénica. Los resultados mostraron que la subpoblación sSca⁺ se diferenció preferencialmente al linaje osteogénico y en menor medida al linaje condrogénico comparado con las células control (sin medio de diferenciación) y con las células de la subpoblación sSca⁻ (Figura 12). Notablemente, en la micromasa proveniente de la subpoblación sSca⁺, además de la disminución en la diferenciación hacia el linaje condrogénico, se observaron células alargadas de apariencia fibroblastoide, lo cual sugirió que podría tratarse de células que se están diferenciando ya sea hacia el linaje tenogénico o miogénico (Figura 12). Por otro lado, la subpoblación sSca⁻, se diferencia preferencialmente al linaje osteogénico con respecto a las células control, pero esta diferenciación fue menor comparada con la de las células sSca⁺ (Figura 12). Sin embargo, en la subpoblación sSca⁻ no se observó ningún cambio en la diferenciación hacia el linaje condrogénico respecto a las células totales (Figura12). Estos resultados son importantes debido a que demuestran que los marcadores de MSC permiten aislar subpoblaciones en la extremidad embrionaria con diferencias en su capacidad de diferenciación. Asimismo, muestran que la subpoblación sSca⁺ tiene la capacidad de formar los linajes condrogénico, osteogénico y probablemente miogénico, cuyos progenitores provienen de tejidos distintos durante el desarrollo de la extremidad. Con estos resultados se infiere, además, que ambas subpoblaciones son células multipotentes *in vitro*.

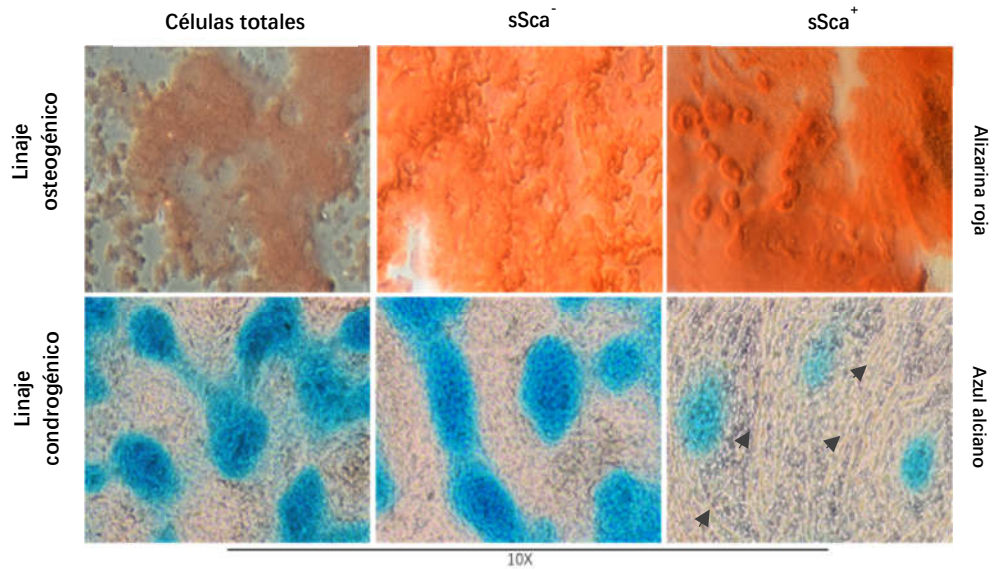


Figura 12 Las subpoblaciones $sSca^+$ y $sSca^-$ difieren en su capacidad de diferenciación *in vitro*.

Imágenes representativas que muestran la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células totales y de las subpoblaciones $sSca^+$ y $sSca^-$ del primordio de extremidad hacia los linajes condrogénico y osteogénico. La diferenciación se evidenció con la tinción de azul alciano para el linaje condrogénico y alizarina roja para el osteogénico. Las flechas indican la localización de las células alargadas formadas bajo condiciones de alta densidad.

6.2.4 El perfil génico de las subpoblaciones $sSca^+$ y $sSca^-$ las define como células en diferente estado de compromiso.

Para determinar si la distinta capacidad de diferenciación *in vitro* observada en las subpoblaciones se debe a una diferencia inicial en su perfil de expresión, la cual estuviera relacionada con la capacidad de respuesta de las células a los medios inductores, se evaluó el perfil de expresión de genes tempranos y tardíos de diferenciación hacia el linaje condrogénico (*Sox9*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Agrecano*), tenogénico (*Scx*, *Osr2*, *Mhw*, *Col1a1*), osteogénico (*Runx2*, *Col10a1*, *Opn*, *Osx*) y miogénico (*Pax3*), además de genes que han sido relacionados con células indiferenciadas en la extremidad embrionaria (*Msx1*, *AP2*, *Sprouty1*, *Sprouty2*, *Meis1*, *Prx1*) en ambas subpoblaciones mediante qRT-PCR. En la gráfica de la figura 13, se muestra que la subpoblación $sSca^+$ tiene niveles de expresión mayores respecto a la subpoblación $sSca^-$ de los genes *Sprouty2* y *Meis1*, así como de los genes tempranos de diferenciación *Scx*, *Runx2* y *Pax3*, resaltando estos dos últimos por sus altos niveles de expresión (2.62 y 42.61 respectivamente). Por otro lado, se puede interpretar que

la subpoblación $sSca^-$ expresa niveles mayores del gen *Sox9* y de los genes *Msx1* y *Sprouty1* respecto a la subpoblación Sca^+ (Figura 13). Los resultados obtenidos demuestran que las subpoblaciones $sSca^-$ y $sSca^+$ tienen perfiles de expresión génica diferentes y que se tratan de poblaciones celulares con un nivel distinto de compromiso. Además, muestran que la población $sSca^+$ expresa altos niveles de *Runx2* y *Pax3*, genes tempranos de dos linajes celulares que en el desarrollo se originan de manera diferente en la extremidad embrionaria. Esto llevó a plantear las siguientes preguntas: ¿a cuál de estos dos linajes (miogénico u osteogénico) da origen la subpoblación $sSca^+$ durante el desarrollo? y ¿en qué momento del desarrollo esta subpoblación celular se compromete hacia alguno de los dos linajes? Debido a que se trata de la subpoblación $sSca^+$, ¿la expresión de *Sca1* es suficiente para inducir los genes tempranos de diferenciación hacia los linajes osteogénico y/o miogénico y a su vez reprimir la condrogénesis?

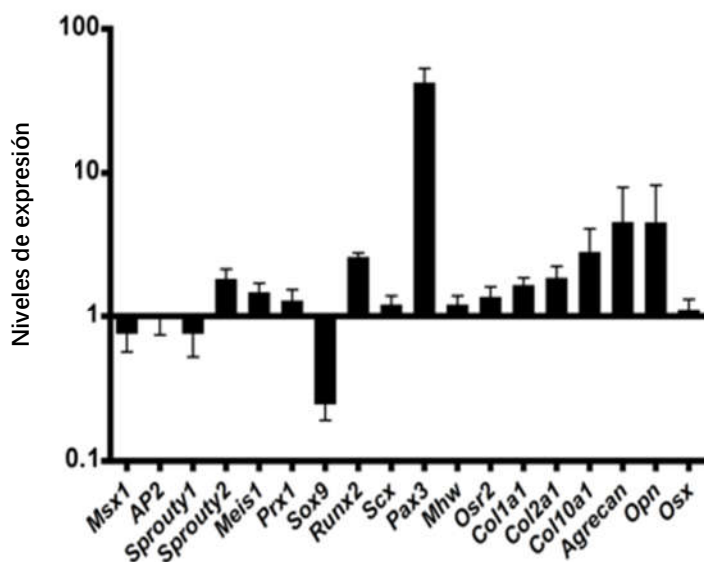


Figura 13 Las células $sSca^+$ expresan niveles mayores de genes tempranos de diferenciación osteogénica y miogénica en comparación con las $sSca^-$.

Evaluación por qRT-PCR de los niveles de expresión de genes tempranos y tardíos de diferenciación hacia los linajes tenogénico, osteogénico, miogénico y condrogénico así como de genes asociados a células indiferenciadas en la extremidad embrionaria en células de las subpoblaciones $sSca^+$ y $sSca^-$. Los valores representados en las barras corresponden al nivel de expresión génica obtenido en la subpoblación $sSca^+$ normalizado a uno con los valores de la subpoblación $sSca^-$. Cada valor es el promedio de tres experimentos independientes. Las líneas sobre las barras corresponden a la desviación estándar de los valores obtenidos.

6.2.5 Capacidad de diferenciación y capacidad morfogenética *in vivo* de las células Sca1-positivas

Hasta este punto, los resultados han mostrado que el gen *Sca1* diferencia a dos subpoblaciones de la extremidad con distinto perfil génico y distinta capacidad de diferenciación *in vitro*. Con base en estos resultados, en este trabajo fue de interés evaluar si la capacidad de diferenciación de ambas subpoblaciones observada *in vitro* se mantenía *in vivo* y/o si alguno de los linajes se favorecería debido a la presencia de las señales que dirigen el desarrollo y diferenciación en la extremidad. Una forma de evaluar tanto la capacidad de diferenciación como la capacidad morfogenética de una población celular en el contexto de la extremidad es mediante la técnica de extremidades recombinantes (ER)¹¹⁸⁻¹²⁰. Esta técnica consiste en rellenar un ectodermo de primordio de extremidad de un embrión de pollo donador con células, en este caso, las células mesenquimales de las subpoblaciones de primordio de extremidad ratón, e implantarlo en otro embrión de pollo receptor y permitir su desarrollo para posteriormente evaluar el fenotipo obtenido. La limitante de esta técnica es que se requiere un número de células suficientes para generar un botón celular visible con el cual se puedan rellenar los ectodermos. Con la finalidad de producir ER con las subpoblaciones, se realizaron al menos seis intentos para obtener un pellet suficiente de células pertenecientes a las subpoblaciones sSca⁺ y sSca⁻ después de ser separadas mediante citometría de flujo. Sin embargo, este objetivo no se logró debido al bajo porcentaje de células de las subpoblaciones *per se*, además de las características del citómetro de flujo con el que se realizaron estos ensayos. Cabe resaltar que cada uno de los ensayos para intentar obtener un botón celular de las subpoblaciones se realizó con los embriones de entre 10 y 12 hembras gestantes, las cuales siempre contaban con al menos 10 embriones cada una. De ambos primordios de los 120 embriones (en promedio) se obtenían aproximadamente 18 millones de células, lo que significa que únicamente se obtenían por ensayo un máximo de 186,000 células de la subpoblación Sca⁺ lo cual en todos los casos resultó insuficiente para formar un pellet y poder realizar las ER. Debido a esta dificultad técnica, se decidió como estrategia alternativa electroporar células totales del primordio E10.5 con un plásmido para sobreexpresar el gen *Sca1* y evaluar la

capacidad de diferenciación y morfogénesis dirigida por este gen. A las células totales electroporadas con el plásmido Sca1-GFP (anexo 5) se les denominó células Sca++.

Lo primero que se encontró fue que es posible realizar ER con células provenientes de primordios de ratón y con ectodermos de pollo. Se observó que a los seis días posterior a la implantación de los ectodermos rellenos con células totales no electroporadas, se formaron elementos esqueléticos dispuestos de manera muy parecida a la que sucede durante el desarrollo embrionario; un elemento central rodeado por células más laxas aparentemente indiferenciadas interrumpido por una probable articulación (Figura 14). Por el contrario, en las muestras que se dejaron desarrollar únicamente por 5 días, no hay formación de ningún elemento esquelético en la ER (Figura 14). El hecho de que haya sido posible formar una ER en embriones de pollo con células de primordios ratón constata la efectividad del sistema para evaluar morfogénesis y diferenciación en estas células.

Siguiendo la estrategia de electroporación, después de seis días de desarrollo, en las ER realizadas con las células Sca++ no se observó ningún elemento esquelético central con características de cartílago, sino que las células de la ER presentan una morfología alargada y dispuesta a manera de fibras (Figura 14). Debido a las características morfológicas observadas en estas ER, los datos sugieren que la expresión del gen *Sca1* inhibe la diferenciación condrogénica y favorece, probablemente, la diferenciación hacia el linaje miogénico *in vivo*.

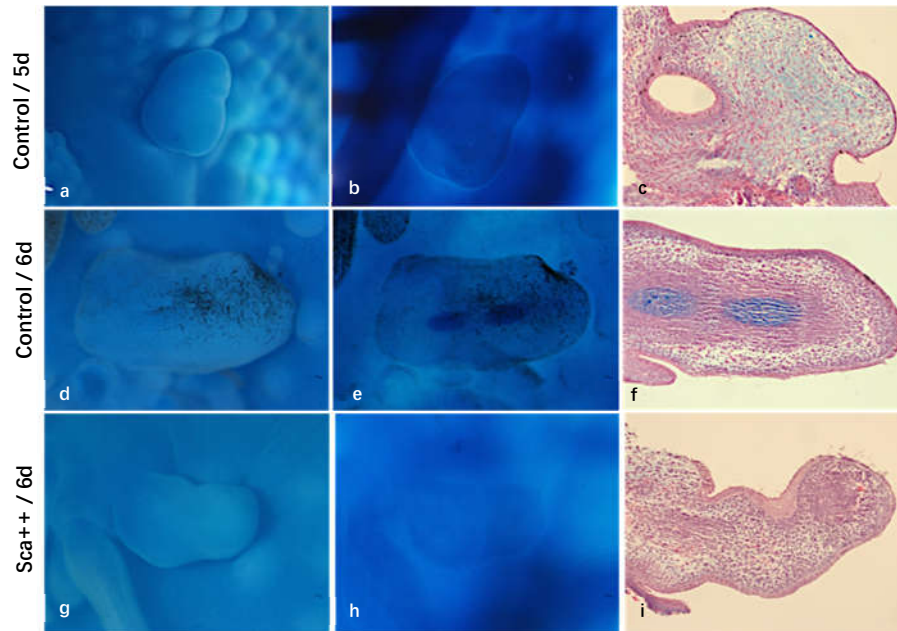


Figura 14 La sobreexpresión del gen *Sca1* en las células del primordio inhibe la condrogénesis in vivo.

Imágenes representativas de extremidades recombinantes teñidas con azul alciano (a, b, d, e, g, h) sin transparentar (a, d, g) o transparentadas (b, e, h) para evidenciar la formación de cartílago. Como control se realizaron ER con células totales sin electroporar (a, b, c, d, e, f). Extremidades recombinantes realizadas con células electroporadas con el gen *Sca1* (g, h, i). Las fotografías c, f, i corresponden a cortes histológicos teñidos con azul alciano y hematoxilina y eosina de las extremidades recombinantes.

6.2.6 Dinámica de expresión de los marcadores asociados a MSC en otras etapas del desarrollo de la extremidad

Para conocer si la localización y presencia de los marcadores asociados a MSC se mantiene o cambia durante el desarrollo embrionario de la extremidad, se realizó una comparación de la expresión los marcadores mediante inmunodetección en una etapa previa y posterior a la E10.5. Se encontró que la expresión de la integrina $\beta 1$ (CD29) es evidente en el mesénquima desde la etapa E10.5 manteniéndose hasta la etapa E11.5, encontrándose allí una mayor expresión. En la E10 CD29 solo se expresa en el ectodermo del primordio. El marcador Sca1 no se expresa en la etapa E10, mientras que en la E10.5 y E11.5 se observan pocas células positivas a este marcador. Cabe resaltar que su expresión en ambas etapas se restringe al mesénquima de los primordios. Por otro lado, el receptor de hialuronato (CD44) se localiza claramente en la AER en las tres etapas evaluadas, aunque, desde la etapa E10 se observa un par de células positivas en el mesénquima del primordio. En el caso del marcador CD90, únicamente se encontraron células positivas en la etapa E11.5 tanto en ectodermo como en el mesénquima. La mayoría de las células positivas a este marcador se localizan en la parte media y proximal del primordio. Por otra parte, en las tres etapas, CD105 corresponde a células endoteliales. Finalmente, el marcador CD73 está presente en la etapa E10.5 en el ectodermo dorsal del primordio, mientras que en las otras dos etapas no se encontraron células positivas a este marcador (Figura 15).

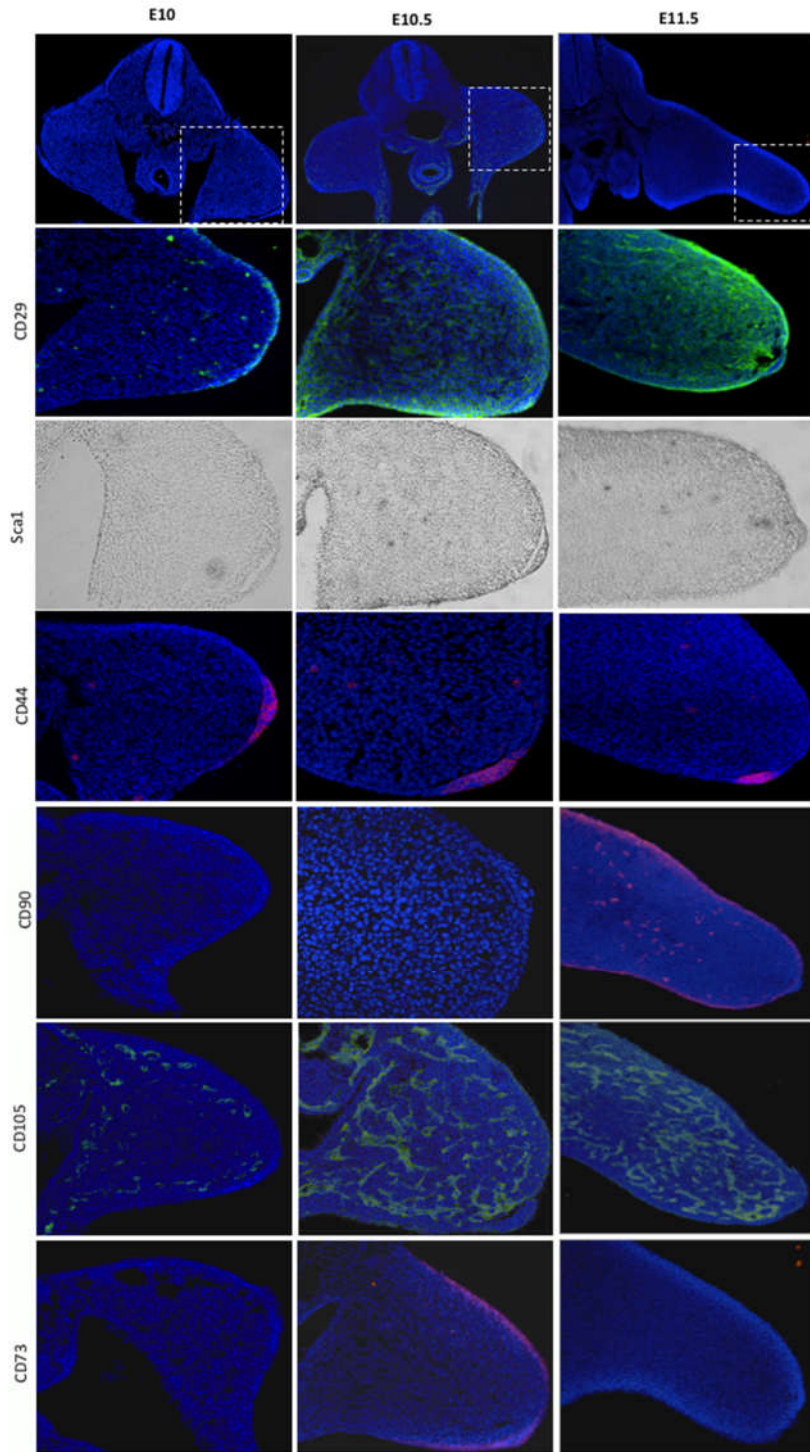


Figura 15 La localización y expresión de los marcadores de MSC se modifica de acuerdo a la etapa del desarrollo.

Immunolocalización de los marcadores de MSC CD29, Sca1, CD44, CD90, CD105 y CD73 en tres etapas del desarrollo de la extremidad. En la primera fila de imágenes se muestra un corte transversal de un embrión de ratón de cada etapa evaluada a la altura de los primordios posteriores. Dentro del recuadro se muestra la localización correspondiente a las imágenes posteriores. Todas las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. En todos los casos, los núcleos se tiñeron con DAPI.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Métodos de obtención de células que expresan marcadores de MSC en la extremidad embrionaria de ratón

Las células mesenquimales estromales multipotentes (MSC) comparten algunas características con las células del primordio de la extremidad. Una cuestión importante de las células del primordio es que se desconoce su estado de compromiso en etapas tempranas. En este trabajo se utilizaron algunos de los marcadores que han sido asociados a MSC para con ellos distinguir la presencia de dos subpoblaciones de células mesenquimales en la extremidad embrionaria.

A pesar de que el método estándar de obtención de MSC es mediante cultivos celulares, existen en la literatura algunos estudios que han evaluado la presencia de marcadores de MSC en diversos tejidos a partir de células recién aisladas. Estos trabajos muestran que en estas condiciones la expresión de los marcadores de MSC es baja comparada a la observada en las células caracterizadas después de su adherencia en cultivo. Ejemplo de esto son los observados con los marcadores CD44, CD105 y CD90 evaluados en tejido adiposo y los marcadores CD44 y Sca1 evaluados en células obtenidas de médula ósea y de calvaria fetal de rata¹²¹⁻¹²⁴. Por esta razón y con la intención de identificar subpoblaciones presentes en el primordio de la extremidad bajo un contexto cercano al que sucede durante su desarrollo, se analizó de manera comparativa la expresión de marcadores asociados a las MSC en las células del primordio recién aisladas y en las células después de ser cultivadas. Los resultados mostraron que los marcadores de MSC se expresan en un bajo porcentaje de células recién aisladas a partir de primordios de extremidad E10.5, además de expresar niveles bajos de genes asociados a diferenciación. Estos resultados confirman que las células del primordio en esta etapa del desarrollo se encuentran en un estado indiferenciado. En cuanto a su capacidad de diferenciación *in vitro*, las células recién aisladas originan los linajes osteogénico y condrogénico, pero la capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico es reducida. Es importante resaltar el hecho de que las células recién aisladas provenientes de los primordios de las extremidades se diferencien de manera directa hacia el linaje osteogénico, ya que se conoce que, durante el desarrollo de la extremidad, el tejido óseo

surge a partir del proceso de osificación endocondral¹²⁵. En un reporte, Akiyama y colaboradores utilizando un ratón transgénico para realizar un mapa de destino genético, determinaron que los linajes condrogénico y osteogénico comparten un mismo progenitor, el cual se identifica por la expresión del factor de transcripción SOX9. Sin embargo, ellos determinaron que la dermis no comparte este mismo progenitor a pesar de que este linaje proviene también del mesénquima de la extremidad³³. Por otro lado, también ha sido demostrado que una población de células mesenquimales proveniente de huesos largos de embriones de ratón en etapa E16.5, basada en la presencia de los marcadores CD9 y CD73 dentro de una población de células CD105-positivas, tiene la capacidad de originar ambos linajes celulares¹²⁶. De manera interesante, la demostración en este trabajo de que las células del primordio son capaces de responder a las señales osteogénicas y de diferenciarse de manera directa hacia este linaje, confirma la presencia de células osteoprogenitoras en la extremidad, que bajo los estímulos correctos es capaz de diferenciarse sin la necesidad de pasar por la etapa de cartílago, es decir, soslayando el proceso de osificación endocondral.

En contraste con los resultados obtenidos en las células no cultivadas, las células seleccionadas por adherencia desde las 24 h de cultivo presentaron un incremento considerable en la expresión de los marcadores de MSC. Este cambio de expresión fue más evidente en los marcadores Sca1 y CD44, pasando de expresarse en el 1.3% de las células no cultivadas al 84.8% después del cultivo y del 1.6% al 90.2%, respectivamente. Además, estas células mostraron también una variación en la expresión de genes asociados a diferenciación hacia los linajes condro- osteo- y adipogénico dependiendo del pase celular en el que fueran evaluados. Asimismo, los resultados de este trabajo demostraron que estas variaciones tanto en el inmunofenotipo como en el perfil de expresión en las células cultivadas se mantienen a lo largo de diferentes pases celulares. En la literatura existen trabajos realizados con diferentes tejidos en los cuales se reporta un fenómeno o comportamiento, esto es, un aumento en el porcentaje de las células que expresan los marcadores Sca1 y/o CD44 en diversos tejidos después de que estas son cultivadas¹²⁷⁻¹³¹. La interpretación que se le da a estos resultados es que las poblaciones de células MSC se expanden y homogenizan al realizar los diferentes pases celulares. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se evalúa el porcentaje inicial de las células que expresan los marcadores característicos

de las MSC antes de ser cultivadas para realmente determinar si se trata o no de una expansión de las poblaciones celulares. En contraste, en este trabajo si se determinó el porcentaje inicial de células dobles-positivas a los marcadores Sca1 y CD44, encontrándose que corresponde únicamente a un 0.64% del total de las células antes de ser sembradas. Este porcentaje, es incluso menor que el observado para las células positivas a cada uno de los marcadores de manera individual, lo que quiere decir que no todas las células que expresan uno de los marcadores necesariamente expresan el otro. Datos publicados con relación a la duración del ciclo celular *in vivo* de las células de los primordios de ratón muestran que este tiene un intervalo de entre 11 y 25 h¹³². En el caso de células adherentes, el tiempo requerido para duplicar la población de células MSC de médula ósea de ratón es de 45-68 h¹³³, mientras que para tejido adiposo y células de médula ósea de rata en promedio es de 38.99 y 49.99 h respectivamente¹³⁴. Para las células MSC de cordón umbilical el tiempo de duplicación es de 24 h y para las de médula ósea humanas es de 40 h¹³⁵. Ya que el tiempo de duplicación de las células MSC de varios tejidos de modelos humanos y murinos es de entre 11 y 68 h, las células del primordio de la extremidad seguramente deben tener un tiempo de duplicación dentro de este rango. Por lo tanto, para que a partir del 0.64% de células inicialmente positivas a los marcadores CD44 y Sca1 del primordio se alcance el porcentaje observado después del cultivo, las células del primordio de la extremidad deberían dividirse al menos 7 veces en menos de 24 h, lo cual resulta improbable. Con base en estas observaciones y considerando además la densidad a la que se sembraron las células, la cual restringe el número potencial de divisiones celulares, es difícil sostener una expansión genuina de la población Sca1/CD44-positiva. También en este trabajo se demostró que el comportamiento de adquisición *in vitro* de los marcadores Sca1 y CD44 es semejante en otros tejidos del embrión de ratón. Por lo tanto, con este trabajo se evidencia que el incremento considerable en la expresión de los marcadores Sca1 y CD44 observado en las células del primordio después de ser cultivadas, se trata de un artificio más que de la selección de una característica intrínseca de las células a través del cultivo por adherencia, pudiendo estar directa y únicamente relacionada con la adhesión celular. Como apoyo a esta idea, está demostrado que la expresión del gen *Sca1* en células MSC de médula ósea disminuye cuando las células son cultivadas en condiciones no adherentes, pero su expresión se ve recuperada después de 5 días de cultivo en condiciones

adherentes¹³⁶. También ha sido reportado que la expresión de otros marcadores como CD73 y CD146, así como diversas integrinas y factores de crecimiento se incrementa abundantemente en células cultivadas en comparación con los valores observados en células recién aisladas de médula ósea¹³⁷. Otro ejemplo es el de la población CD146⁻/CD34⁺, la cual siendo aislada de manera directa mediante citometría de flujo a partir de células de médula ósea, que al momento de ser cultivada adquiere el marcador CD146 y se convierte en una población CD146⁺/CD34⁺ *in vitro*¹³⁸.

Otro dato interesante por considerar cuando las células del primordio de la extremidad son cultivadas, es el cambio que ocurre en la expresión de los genes maestros que dirigen la diferenciación celular hacia los linajes presentes en la extremidad, que, además, son considerados linajes que caracterizan a las MSC en cuanto a su capacidad de diferenciación *in vitro*. Sin cultivo, las células del primordio de la extremidad expresan niveles bajos, casi nulos, de genes de diferenciación condrogénicos, osteogénicos y adipogénicos. Pero al momento de ser cultivadas sin necesidad de medios inductores, los genes obedecen a una dinámica de aumento y disminución a través de los pases. Estos resultados sugieren que *per se*, el cambio en la expresión de los genes puede modificar la capacidad de respuesta a los componentes de los medios con los que se cultivan las células para inducir su diferenciación *in vitro*. O bien, la ausencia de las señales represoras o activadores de diferenciación hacia los diferentes linajes presentes en la extremidad embrionaria en desarrollo podría influir en la toma de decisiones del destino celular *in vitro*. Ya que como lo muestran los datos obtenidos en este trabajo, la capacidad de diferenciación *in vitro* a lo largo de los diferentes pases es variable en comparación con las células que no fueron cultivadas. Esto es importante resaltarlo, ya que al considerarse de manera habitual la adherencia y pasaje celular como la forma de homogeneizar y seleccionar a las MSC, es probable que dependiendo del pase en el que se evalúen las células tengan un comportamiento particular en cuanto a su capacidad de diferenciación *in vitro*. Por ejemplo, una investigación previa realizada con extremidades embrionarias de humano de 6 semanas de gestación (lo que correspondería a E13.5 dpc en ratón), mostró que las células adherentes de las extremidades, expresaban marcadores de MSC, y que son capaces de diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteogénico, neurogénico y hepatogénico⁷⁴. Debido a estas características estos autores consideraron a las células de las extremidades como “células pluripotentes”. Sin embargo, es

importante resaltar que no realizaron todos los ensayos bajo condiciones homogéneas respecto al número de pasaje celular, ya que, dependiendo del ensayo, las células se evaluaron entre el quinto y treceavo pase. Aunado a esto, cabe resaltar que los autores no evaluaron la capacidad de diferenciación de las células recién aisladas ni su inmunofenotipo inicial.

Un dato muy interesante, que refleja que el basarse en el inmunofenotipo de las células después de ser cultivadas puede modificar la interpretación biológica de los resultados, es el obtenido con las poblaciones CD73⁺/CD39⁻ y CD73⁺/CD39⁺ aisladas de manera directa de células sinoviales, en donde no se observan diferencias en su capacidad clonogénica ni de diferenciación osteogénica y condrogénica. Por el contrario, si el primer paso realizado es el cultivo de las células sinoviales, las subpoblaciones obtenidas posterior a esta condición presentan diferencias entre ellas en su capacidad de diferenciación¹³⁹. Otro claro ejemplo es en el que la adquisición después del cultivo del marcador de pericitos CD146 en células obtenidas de médula ósea, no correlaciona con la función de pericito¹³⁸. En conclusión, el inmunofenotipo adquirido *in vitro*, no necesariamente refleja una relación con la función *in vivo*. De manera interesante y en correlación con los antecedentes expuestos, en este trabajo, aunque en las células del primordio se incrementan significativamente los marcadores CD44 y Sca1 después del cultivo, esta alta expresión no parece determinar un aumento en la capacidad de diferenciación hacia cualquiera de los tres linajes evaluados como si se tratara de células MSC 'puras'. En otras palabras, los marcadores de MSC adquiridos "artificialmente" no promueven en las células un comportamiento de célula progenitora, troncal o con una mayor potencialidad.

Debido a los resultados obtenidos al comparar los métodos de identificación y obtención de las células que expresan marcadores de MSC, se llegó a la conclusión que lo más adecuado para la identificación y posterior caracterización de subpoblaciones en la extremidad embrionaria, es el 'método directo'. Garantizando así la caracterización de un comportamiento celular cercano al que sucede durante el desarrollo de la extremidad.

7.2 Caracterización de subpoblaciones mesenquimales multipotentes en la extremidad embrionaria de ratón

Con base en la expresión y localización en el primordio de la extremidad de los diferentes marcadores de MSC evaluados, en este trabajo se logró identificar dos subpoblaciones de células mesenquimales. A pesar de lo que se conoce acerca de las MSC y sus marcadores, en este estudio se demostró que no todos los marcadores que se han encontrado en las células MSC, necesariamente se encuentran en tejido mesenquimal cuando se evalúan *in situ*. Esto se evidenció con los marcadores CD44 y CD73 los cuales se expresan en las células del ectodermo y con el marcador CD105 que se observó claramente en las células endoteliales del primordio de la extremidad. Esta diferencia podría deberse a que desde los inicios, las investigaciones realizadas en referencia a la identificación de las MSC se realizaron con células en cultivo⁷⁷. Este hallazgo es importante porque tomando en cuenta también los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la adquisición *in vitro* de los marcadores de MSC, ya que hace pensar que el número real de MSC presentes en los tejidos se podría estar sobre estimando. A diferencia de otros trabajos, en los cuales la selección de subpoblaciones celulares a partir de diferentes tejidos se realiza posterior al cultivo¹⁴⁰⁻¹⁴⁴, en este estudio se llevó a cabo un análisis multiparamétrico utilizando los marcadores encontrados de manera frecuente en MSC con el cual se seleccionaron *a priori* dos subpoblaciones que corresponden a células mesenquimales del primordio de la extremidad. La utilización de esta estrategia permitió descartar en las subpoblaciones analizadas otros tipos celulares como células endoteliales, ectodermo y hematopoyéticas. De las dos subpoblaciones evaluadas (sSca⁻ y sSca⁺, Figura 10), la subpoblación sSca⁺ se encuentra en un porcentaje muy bajo en referencia al número total de las células del primordio (1.86%). Considerando que los valores estimados de células MSC de médula ósea de ratón es de 1 célula por cada 11,300-27,00 células¹⁴⁵, este porcentaje tan bajo de la subpoblación podría corresponder también a células progenitoras o incluso con características de troncalidad. Al evaluar la capacidad de diferenciación *in vitro* de ambas subpoblaciones hacia dos de los tipos celulares presentes en la extremidad (condrocitos y osteocitos), la subpoblación sSca⁻ presentó una alta capacidad para diferenciarse hacia el linaje condrogénico y osteogénico. Por su parte, la subpoblación sSca⁺ presenta la mayor capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico, aunque la diferenciación hacia el linaje

condrogénico es reducida. De manera interesante, en las micromasas realizadas con las células de la subpoblación $sSca^+$ se observaron células alargadas y de apariencia fibroblastoide, las cuales por sus características morfológicas podrían pertenecer a los linajes tenogénico y/o miogénico. Se ha descrito que las células progenitoras musculares son capaces de activar genes tempranos de diferenciación miogénica cuando se encuentran cercanas unas de otras o en agregados celulares, a diferencia de cuando las células están separadas. A este fenómeno en donde las células progenitoras tienen la capacidad de responder a los estímulos de diferenciación a medida en que la cantidad de músculo aumenta o que incluso existe una dependencia de que otras células vecinas se diferencien de la misma manera, J. B. Gurdon lo denominó "efecto de comunidad"^{146,147}. Tomando en cuenta este fenómeno, la condición de alta densidad con la que se promueve la diferenciación condrogénica, a la que se sometieron las células de la subpoblación $sSca^+$, podría propiciar la diferenciación hacia el linaje miogénico, considerando que en esta subpoblación hubiera progenitores musculares. Por lo cual, es más probable que las células alargadas observadas en la micromasa correspondan a células musculares diferenciadas. Lo interesante de esto, es que, en esta etapa del desarrollo, los progenitores musculares aún no han invadido completamente el primordio de la extremidad.

Por otro lado, la evaluación del perfil génico de las subpoblaciones mostró que la subpoblación $sSca^+$, en comparación con la $sSca^-$, tiene una mayor expresión de genes maestros que dirigen la diferenciación hacia los linajes tenogénico (*Scx*, *Mhwi*), osteogénico (*Runx2*) y miogénico (*Pax3*), resaltando estos dos últimos por sus altos niveles de expresión. Este resultado es interesante porque se sabe que dichos linajes en la extremidad surgen a partir de dos progenitores distintos^{34,84}. Por un lado, las células progenitoras musculares migran del dermomiótomo hacia el primordio de la extremidad en donde reciben señales para terminar su diferenciación hacia músculo³⁹. Por otro lado, la diferenciación hacia el linaje osteogénico se lleva a cabo mediante el proceso de osificación endocondral⁵⁵. La interpretación de este resultado se puede realizar de varias maneras: existe en la extremidad embrionaria una población de células multipotentes que bajo los estímulos adecuados tienen la capacidad de originar varios linajes que de manera normal durante el desarrollo no se generarían, ya que podría depender de la relación entre las señales que reciba y la expresión basal de genes maestros para obtener una respuesta a

los estímulos de diferenciación; el que una misma población celular exprese altos niveles de los genes *Runx2* y *Pax3* sugieren que podría tratarse de una población preparada para responder de manera rápida al estímulo de diferenciación osteogénica y/o miogénica; o bien, el marcador *Sca1* se encuentra en más de una subpoblación celular que comparte a su vez la expresión de marcador CD29, es decir, la subpoblación sSca⁺ podría tratarse aún de una subpoblación heterogénea en donde, por un lado, se expresa el gen *Runx2* y, por otro, el gen *Pax3* ¿Cuál de estas posibilidades (o si existen otras más) es la que sucede en las células del primordio? aún se desconoce.

Siguiendo con el análisis de los resultados del perfil de expresión génica de las subpoblaciones, se puede inferir también que la subpoblación Sca⁻ se trata de una subpoblación comprometida a diferenciarse hacia el linaje condrogénico ya que expresa altos niveles del gen *Sox9*, pero a su vez es capaz de responder a los estímulos de diferenciación osteogénica. Este hecho correlaciona con la propuesta de la existencia de un osteocondroprogenitor en las células mesenquimales del primordio de la extremidad³³. En conjunto estos resultados evidencian que, en esta etapa del desarrollo, a pesar de que el primordio está compuesto por células en apariencia homogéneas, existen poblaciones celulares con diferencias en su capacidad de respuesta a diversos estímulos de diferenciación o bien, que en ese momento del desarrollo se estableció ya una jerarquía de progenitores las cuales bajo ciertas señales y la interpretación adecuada de las mismas, continúan el camino hacia la diferenciación.

Recientemente, ha surgido el interés por estudiar la ontogenia de las MSC. En el 2017, el grupo de Rolf Zeller, publicó un trabajo en donde el objetivo principal fue identificar el surgimiento de diferentes tipos de MSC durante el desarrollo de la extremidad y de los huesos largos, ya que allí se forma la médula ósea. De la misma manera que en este trabajo de tesis, utilizando la estrategia de marcaje múltiple y aislamiento por citometría de flujo, los autores identificaron y caracterizaron en extremidades en diferentes etapas del desarrollo a tres poblaciones: "PaS"(PDGFRa⁺, SCA1⁺, CD45⁻, TER119⁻), "CD200⁻, CD51⁺, CD90⁻, CD105⁻, 6C3⁻" (*mouse skeletal stem cells*, mSSc)¹⁴⁸ y "PaCD51"(PDGFRa⁺, CD51⁺). Identificaron que la población PaS y la mSSc son poblaciones independientes y que surgen desde etapas tempranas del desarrollo (E10.5) a partir de la población PaCD51. De manera interesante, lo que encontraron fue que la población PaS es la más abundante de todas y que se subdivide en cuatro subpoblaciones

utilizando combinaciones de expresión de los marcadores CD90 y CD73. Cabe resaltar que esta subdivisión surge en la etapa E15.5. Además, los autores sugieren que la población PaS (la cual expresa el marcador Sca1⁺) es la más primitiva de las tres poblaciones evaluadas, debido a las características de su perfil de expresión¹⁴⁹. Estos datos correlacionan con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la expresión del gen *Sca1* podría estar relacionada con poblaciones indiferenciadas o con una alta capacidad de diferenciación en la extremidad. Además, este trabajo refuerza la conveniencia de la utilización de la estrategia de caracterización directa de las subpoblaciones celulares y la idea de que en el primordio las células desde etapas tempranas son altamente distinguibles entre sí respecto a su firma molecular y su capacidad de respuesta a diversos estímulos.

Por otro lado, existe otro reporte en donde se pretendía evaluar también el surgimiento de una población de MSC en el embrión y seguir su destino hasta etapas adultas¹⁵⁰. La idea es buena, sin embargo, la aproximación de los autores asumió que todas las células PDGFRa⁺, correspondían a MSC. Además, aislaron y caracterizaron a las células PDGFRa⁺ tanto de embriones completos como de extremidades embrionarias, y así es como ellos determinaron que en la etapa E13.5 es en donde se encuentra la mayor cantidad de células PDGFRa-positivas y por lo tanto sugieren que en ese momento en el desarrollo es cuando surgen las "MSC". Un error grave en este trabajo es confundir el gen *Sca1*, *Stem cell antigen (Ly6A)* con el gen *Spinocerebral ataxia type 1 (Atxn1)*, también denominado Sca1 por sus siglas en inglés. Por lo tanto, los resultados de este trabajo no pueden interpretarse de la manera en que los autores lo hacen.

A diferencia de estos dos últimos trabajos, en esta investigación se evaluó la capacidad de diferenciación y de morfogénesis *in vivo* mediante la técnica de "Extremidades Recombinantes" utilizando células de primordios tempranos de extremidad que sobreexpresan el gen Sca1 (células Sca⁺⁺). Analizando los resultados, se puede constatar que con esta aproximación *in vivo* los datos correlacionan con los resultados obtenidos *in vitro*, ya que en las ER realizadas con células Sca⁺⁺ (simulando a la subpoblación sSca⁺) no se observa la formación de elementos esqueléticos después de 6 días de desarrollo. Lo que sugiere una disminución en la condrogénesis. Esto puede deberse a que la expresión del gen *Sca1* promueve la diferenciación hacia otros linajes no condrogénicos (probablemente con capacidad miogénica, tomando en cuenta la morfología

observada) o bien, podría deberse solamente a un “retraso” en la formación de los elementos esqueléticos. Está demostrado que en el ratón *knock-out* para el gen *Sca1*, los progenitores osteogénicos se agotan a largo plazo y esta condición lleva a la aparición de osteoporosis en ratones adultos¹¹⁵. En este sentido, es posible que en las ER realizadas con células Sca++ se esté promoviendo el mantenimiento de un pool específico de progenitores no condrogénicos, pero sí osteogénicos. Para evaluar esto sería necesario mantener las ER desarrollando por más tiempo y determinar la expresión de genes osteogénicos. Por otro lado, al realizar la ER con células no electroporadas, la presencia de un elemento esquelético central, bien definido, se observa desde el día cinco de desarrollo. Incluso, se puede apreciar la presencia de una probable articulación. Hasta este momento, no se tiene conocimiento de algún trabajo publicado en donde se haya realizado esta técnica utilizando células de ratón para rellenar los ectodermos, en cambio sí se han realizado ER con células provenientes de embriones de pollo o de codorniz¹⁵¹. La importancia de la realización de una ER ratón-pollo, radica también en la validación de este modelo de ER para evaluar el comportamiento *in vivo* de una población celular sin importar que se trate de especies distintas. La referencia más cercana que se conoce hasta el momento son trabajos realizados en donde se generan quimeras con células de tubo y cresta neural de ratón trasplantadas en embriones de pollo, con el objetivo de evaluar diferenciación celular¹⁵²⁻¹⁵⁴. Siendo tan versátil la técnica de ER, dependiendo de la pregunta biológica a contestar, las células a evaluar se pueden elegir con base en un momento del desarrollo específico y/o con base en una zona particular del primordio de la extremidad. Incluso podrían realizarse con otro tejido embrionario o adulto.

Otra observación importante que se evidenció con las ER realizadas con las células Sca++, fue que además de inhibirse la condrogénesis, el tejido que se forma a los seis días de desarrollo de la ER tiene un aspecto fibroso. Tomando en cuenta que: 1) la subpoblación sSca⁺ presenta altos niveles de expresión del gen *Pax3* (encontrado en progenitores musculares), 2) la inducción de la expresión del gen *MyoD* en las micromasas realizadas con células Sca++, y 3) aunado al conocido efecto de comunidad que siguen los progenitores musculares es probable que la presencia de *Sca1* favorezca la diferenciación miogénica *in vivo*, por lo tanto, el tejido observado en las ER corresponda a tejido muscular. En apoyo a esta hipótesis, existen antecedentes que demuestran

la presencia de SCA1 en células con capacidad miogénica e incluso osteogénica en tejidos adultos. En 2003, Corbel y colaboradores¹⁵⁵ le inyectaron a un ratón irradiado una sola célula de la subpoblación c-Kit⁺Lin⁻Sca⁺ (obtenida a partir de médula ósea) y observaron que el 30% de la progenie de esa única célula se diferenciaba *in vivo* de manera espontánea a miofibras, y que además este porcentaje aumentaba al realizar el trasplante en ratones tratados con miotoxina¹⁵⁵. Otros estudios han demostrado por ejemplo, que las células Sca⁺ de músculo obtenido de lengua de ratón aisladas por citometría de flujo tienen capacidad de diferenciación osteogénica¹⁵⁶, o bien, que la subpoblación de células con inmunofenotipo PDGFR α ⁺,Sca1⁺,Tie2⁺,CD31⁻,CD45⁻ obtenidas de músculo adulto de ratón son multipotentes *in vitro* para los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, y de que después de tratarlas con BMP2 e inyectarlas en un ratón receptor, forman una osificación heterotrópica¹⁵⁷. Por otro lado, la población celular PDGFR α ⁺ obtenida de músculo humano adulto, también presenta osteogénesis *in vitro* e *in vivo*¹⁵⁸. Aunque en este último trabajo los autores no evalúan la presencia de *Sca1*, es referencia de la presencia de células con capacidad osteogénica en tejido muscular. Un dato interesante, es que las células satélite obtenidas de ratón adulto se diferencian a osteocitos y adipocitos además de miocitos y que estas células coexpresan los genes *MyoD* y *Runx2*¹⁵⁹. Este dato correlaciona con las características encontradas de la subpoblación sSca⁺ en este trabajo. Por último, Mitchell y colaboradores demostraron que tanto la línea miogénica C2C12, miofibras en cultivo y miofibras recién aisladas expresan Sca1 (21, 20 y 2% respectivamente) y que, en todos los casos, el porcentaje de células Sca-positivas aumenta al inducir la diferenciación miogénica. Los autores proponen que las células satélite en el músculo adulto son Sca-negativas, pero que originan progenie Sca-positiva, las cuales que tienen el papel de regular el crecimiento y la diferenciación del tejido muscular adulto, ya que estas células son altamente moduladas por el micromambiente¹⁶⁰. Estos antecedentes, apoyan la idea de que la subpoblación de células Sca⁺ presente en la extremidad embrionaria E10.5 es una población multipotente, que permanece hasta etapas adultas y tiene la capacidad de responder a estímulos de diferenciación de al menos dos linajes: osteogénico y miogénico, dependiendo de las señales a las que sea sometida.

Finalmente, se demostró que la expresión de la mayoría de los marcadores en la extremidad embrionaria es dinámica, por supuesto, la expresión de genes y proteínas dependerá

del contexto de cada célula y de las señales que reciba e interprete en cada momento. Sin embargo, los marcadores mesenquimales Sca1 y CD29, en conjunto se encuentran presentes en las etapas E10.5 y E11.5, lo cual sugiere que en la E11.5 es posible también encontrar las subpoblaciones sSca⁻ y sSca⁺. Si estas subpoblaciones tienen el mismo comportamiento en ambas etapas del desarrollo se desconoce.

VIII. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, queda claro que la utilización de marcadores de MSC como herramienta para aislar células mesenquimales, permite seleccionar y homogeneizar subpoblaciones presentes en la extremidad en desarrollo. Con este trabajo, se demuestra que, desde etapas tempranas del desarrollo embrionario, la extremidad está formada por células con una capacidad diferencial para responder a diversos estímulos. Estos resultados tienen implicaciones en la manera de interpretar el desarrollo de la extremidad, más allá de ver al primordio como un cúmulo de células que al mismo tiempo recibe diferentes señales para organizarse y diferenciarse, hay que considerar el momento en el que cada población celular está recibiendo e interpretando información. Por otro lado, la información obtenida referente a la adquisición *in vitro* de marcadores asociados a MSC, abre las puertas para reevaluar a fondo la manera en la que se están caracterizando y denominando a las MSC en los organismos adultos, ya que la información generada a partir de células aisladas por adherencia podría no representar las características *in vivo* de las poblaciones progenitoras o troncales de un tejido.

Existen una gran cantidad de estudios enfocados a la aplicación terapéutica de las MSC, incluida su identificación en diferentes tejidos adultos. En años recientes se ha evidenciado el interés por establecer la ontogenia de estas células en el embrión. Una repercusión biológica importante de los resultados de este proyecto es que ahora se tiene mayor información para entender los mecanismos que controlan la especificación de los destinos celulares y poder entender su jerarquía durante el desarrollo de la extremidad. Ahora, es de interés conocer si estas subpoblaciones cambian su potencial de diferenciación y morfogénico cuando provienen de distintas etapas del desarrollo de la extremidad embrionaria. O bien, sin importar la etapa de desarrollo de donde provengan, si responden por igual a señales presentes en la extremidad.

X. APÉNDICES

Anexo 1: Soluciones y colorantes

PBS 1X

NaCl 8g
KCl 0.2g
Na₂HPO₄ 1.44g
Agua DB 800ml
Ajustar pH a 7.4, esterilizar.

PFA 4%

Paraformaldehido 4g
NaOH 10N 0.6µL
PBS 10X 10ml
Aforar a con agua DB a 100ml, filtrar

Amortiguador de lisis AKC

NH₄Cl 150mM
KHCO₃ 10mM
Na₂EDTA 0.1mM
Disolver en agua BD
Ajustar pH a 7.4

Amortiguador FACS

DNAsa 5U/ml
EDTA 1mM
SFB inactivado 1%
HEPES 25mM
Diluir en PBD libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺
Ajustar pH a 7.4.

Solución de alizarina roja

Alizarina roja 0.2g
Aforar a 100ml con agua
Ajustar pH a 4.2 con NH₄OH

Solución de Hanks

KCl 0.16g
KH₂PO₄ 0.024g
NaCl 3.2g
Na₂CO₃ 0.145g
Disolver en 350ml de agua MQ
Esterilizar
Agregar 4ml de glucosa 10% en PBS 1X
Ajustar pH a 7
Aforar a 400ml con agua MQ
Filtrar

Fijador de Khale

Ácido acético glacial 10ml
Etanol 96 150ml
Formol 60ml
Agua BD 300ml

Solución de gelatina 5% para laminillas

Grenetina en polvo 2.5g
Cr₂(SO₄)₃ 0.125g
Disolver en agua DB a 60°C
Aforar a 500ml

Solución de azul alciano 0.5%

Azul alciano 0.5g
Aforar a 100ml con HCl 0.1N diluido en etanol 70%

Solución autofluorescencia

CuSO₄ 1mM
C₂H₇NO₂ 50mM, pH5
Preparar al momento

Anexo 2: Anticuerpos

Anticuerpo	Marca	No. de catálogo	Aplicación	Dilución utilizada
α -CD29-APC	Biolegend	102216	Citometría de flujo	1:100
α -Sca1-PE/Cy7	Biolegend	108113	Citometría de flujo	1:300
α -CD73-PE	Biolegend	127205	Citometría de flujo	1:400
α -CD44-FITC	Biogems	06511-50	Citometría de flujo	1:100
α -CD44-PE	Biolegend	103007	Citometría de flujo	1: 300
α -CD105-APC	Biolegend	120413	Citometría de flujo	1:100
α -CD90-FITC	Abcam	ab-25672	Citometría de flujo	1:200
α -CD45-PerCP	Biolegend	103131	Citometría de flujo	1:300
α -CD117-APC/Cy7	Biolegend	105825	Citometría de flujo	1:100
α -Flk1-PE	BD Pharmigen	555308	Citometría de flujo	1:300
α -CD49e-biot	Biolegend	103804	Citometría de flujo	1:300
APC Rat IgG2a, k Isotype Control	Biolegend	400511	Citometría de flujo	1:100
APC/Cy7 Rat IgG2b, k Isotype Control	Biolegend	400623	Citometría de flujo	1:100
FITC Rat IgG2c, k Isotype Control	Biolegend	400705	Citometría de flujo	1:200
PE Rat IgG1, k Isotype Control	Biolegend	400407	Citometría de flujo	1:100
PE/Cy7 Rat IgG2a, k Isotype Control	Biolegend	400521	Citometría de flujo	1:300
PerCP/Cy5.5 Rat IgG2b, k Isotype Control	Biolegend	400631	Citometría de flujo	1:300
PE Rat IgG2b, k Isotype Control	Biolegend	400607	Citometría de flujo	1:300
α -CD29	R&D Systems	AF2405	Inmunofluorescencia	1:250
α -Sca1/Ly6A	R&D Systems	BAM1226	Inmunohistoquímica	1:300
α -CD90	R&D Systems	AF7335	Inmunofluorescencia	1:100
α -CD73	Abcam	Ab71822	Inmunofluorescencia	1:500
α -CD105	R&D Systems	AF1320	Inmunofluorescencia	1:100
α -CD44-PE	Biolegend	103007	Inmunofluorescencia	1:300

α -CD117-APC/Cy7	Biolegend	105825	Inmunohistoquímica	1:250
α -CD45-biot	R&D Systems	BAM114	Inmunofluorescencia	1:500
α -cabra-Alexa 488	Invitrogen	A11055	Inmunofluorescencia	1:250
α -conejo-Alexa 647	Invitrogen	A31573	Inmunofluorescencia	1:250
α -oveja-Alexa 555	Invitrogen	A21436	Inmunofluorescencia	1:250
α -rata-peroxidasa	Millipore	AP189b	Inmunohistoquímica	1:250

Anexo 3: Oligonucleótidos para qRT-PCR

Gen	Secuencia de los oligonucleótidos (5' → 3')	Tamaño del producto
<i>Gapdh</i>	Fw: gggaagcccatcaccatct Rv: cgacatactcagcaccggc	76pb
<i>Runx2</i>	Fw: gactgtggttacgcatgg Rv: cgttgaacctggctactgg	98pb
<i>Sox9</i>	Fw: ctgaagaaggagagcgagga Rv: gtccagctcgtagcccttcag	83pb
<i>Scleraxis</i>	Fw: aacacggccttcactgc Rv: gcagcgtctcaatctgg	79pb
<i>Pprg</i>	Fw: tgacaaccgagaagatgagc Rv: cttcactcgcttacgggttc	106pb
<i>Col1a1</i>	Fw: gggcaagacagtcacgaat Rv: ggtggagggagtttacga	115pb
<i>Col2a1</i>	Fw: gaaggtgctcaaggttctcg Rv: ctccaggaataccatcagtcc	70pb
<i>Col10a1</i>	Fw: caataggcagcagcattacg Rv: gcgtgccgttcttatacagg	131pb
<i>Osteopontina</i>	Fw: tctgatgagaccgtcactgc Rv: cctcagtcataagccaagc	108pb
<i>Adiponectina</i>	Fw: aacttgtagcaggttgatgg Rv: ccttcagctcctgtcattcc	168pb

<i>Pax3</i>	Fw: cataccagctgtcggagacc Rv: gtacagtgtcggaggaagc	108pb
<i>Mhw</i>	Fw: ttacaagcaccgtgacaacc Rv: agccgacgtctagcattagc	117pb
<i>Tnmd</i>	Fw: tactgtcgtcggaggcaacc Rv: agatgactcgacctccttgg	97pb
<i>Osr2</i>	Fw: cagtgtgcacgagatcacc Rv: tcagctgtcagggtctcc	242pb
<i>Agrecano</i>	Fw: ggcagtggtctgtctcagg Rv: ccttctccagcttcttgagc	101pb
<i>Osterix</i>	Fw: gaggttcaactcgtctgacg Rv: ctcaagtggctgcttctgg	111pb
<i>Prx1</i>	Fw: tctcagagtggttgaactctctcc Rv: gaactaccatcacgctctctcc	92pb
<i>Msx1</i>	Fw: cctacgcaagcacaagacc Rv: tcggcaatagacaggtactgc	108pb
<i>Meis1</i>	Fw: atgatgcatggaggacagc Rv: tgacttgtgcactcattgtcg	97pb
<i>AP2</i>	Fw: cctcgaagtacaaggtcacg Rv: cgacgcgtaagacactcg	71pb
<i>Sprouty-1</i>	Fw: agcctgctacgattctgtcc Rv: gagcaggtcttctcgctacc	93pb
<i>Sprouty-2</i>	Fw: ggtctcggagcagtagcaagg Rv: cactcggattattccatcagc	110pb
<i>Sca1</i>	Fw: ggaggcagcagttattgtgg Rv: gctacattgcagaggtcttcc	153pb

Anexo 4: Condiciones de hibridación in situ por sonda utilizada

Sonda	Micromasas		Whole mount	
	Proteinasa K	Temperatura de hibridación	Proteinasa K	Temperatura de hibridación
<i>m-Runx2</i>	10µg/5min/20°C	65°C	60µg/20min/21°C	68°C
<i>ck-Sox9</i>	10µg/5min/20°C	65°C	60µg/20min/25°C	65°C
<i>m-Sox9</i>	10µg/5min/20°C	65°C	60µg/20min/25°C	65°C
<i>ck-Scleraxis</i>	2µg/5min/20°C	65°C	-----	----
<i>m-MyoD1</i>	10µg/5min/20°C	65°C	60µg/20min/25°C	65°C

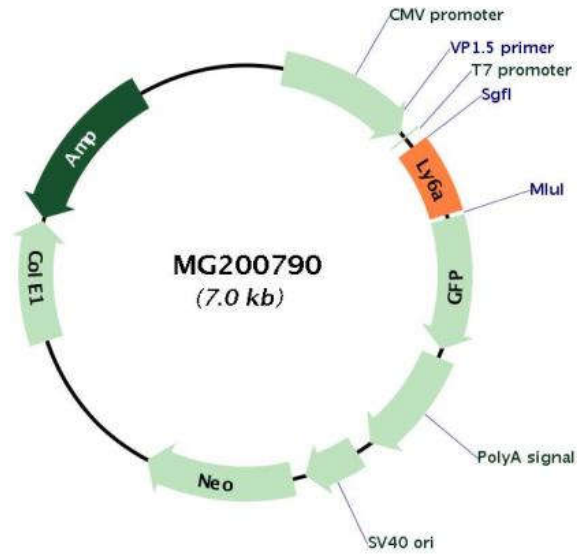
Anexo 5: Plásmidos y construcciones

5.1 Plásmido *Sca1-GFP*

[Ly6a GFP-tagged)-Mouse lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a)]


Cat. No. MG200790

Origene



RESEARCH ARTICLE

A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture

Jessica Cristina Marín-Llera and Jesús Chimal-Monroy *

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria. Apartado Postal 70228, México

Abstract

Skeletal progenitors are derived from resident limb bud mesenchymal cells of the vertebrate embryos. However, it remains poorly understood if they represent stem cells, progenitors, or multipotent mesenchymal stromal cells (MSC). Derived-MSC of different adult tissues under in vitro experimental conditions can differentiate into the same cellular lineages that are present in the limb. Here, comparing non-cultured versus cultured mesenchymal limb bud cells, we determined the expression of MSC-associated markers, the in vitro differentiation capacity and their gene expression profile. Results showed that in freshly isolated limb bud mesenchymal cells, the proportion of cells expressing Sca1, CD44, CD105, CD90, and CD73 is very low and a low expression of lineage-specific genes was observed. However, recently seeded limb bud mesenchymal cells acquired Sca1 and CD44 markers and the expression of the key differentiation genes *Runx2* and *Sox9*, while *Scx* and *Pparg* genes decreased. Also, their chondrogenic differentiation capacity decreased through cellular passages while the osteogenic increased. Our findings suggest that the modification of the cell adhesion process through the in vitro method changed the limb mesenchymal cell immunophenotype leading to the expression and maintenance of common MSC-associated markers. These findings could have a significant impact on MSC study and isolation strategy because they could explain common variations observed in the MSC immunophenotype in different tissues.

Keywords: CD44; chondrogenesis; limb bud mesenchymal cells; mesenchymal stromal cells; osteogenesis; Sca1

Introduction

Limb skeletal progenitors arise from lateral plate mesoderm during the formation of the early limb bud. These cells are organized in an undifferentiated and apparently homogeneous mesenchymal cells group that is surrounded by an ectoderm. Limb bud progenitors differentiate into cartilaginous skeletal elements, tendons, and ligaments. Bone differentiation occurs once cartilage tissue is replaced by bone during the process of endochondral ossification. The coordinated control of cell differentiation and morphogenesis during limb development regulate the tridimensional organization of skeletal elements, tendons, and ligaments. Cartilage progenitors express *SRY-box 9 (Sox9)* and *Collagen 2a1 (Col2a1)* genes that prefigure the future skeletal elements (Chimal-Monroy et al., 2003). Through development, the formation of tendons and ligaments, which

express *Collagen 1a1 (Col1a1)*, is triggered by *Scleraxis (Scx)* in the undifferentiated mesenchymal cells of the tenogenic zones (Schweitzer et al., 2001). Later, osteoblast differentiation begins with the expression of *Runt-related transcription factor 2 (Runx2)*, followed by *Osteopontin (Ssp1)* expression during osteocyte differentiation (Karsenty et al., 1999). Although it is known that precursors of skeletal tissues are undifferentiated mesenchymal cells (Lorda-Diez et al., 2014), it remains poorly studied if they represent cells with characteristics of stem cells or multipotent mesenchymal stromal cells (MSC).

MSC are spindle-shaped plastic-adherent cells isolated from various adult tissues, such as bone marrow, adipose tissue, and placenta, as well as from fetal sources (e.g., the umbilical cord, blood, and amniotic fluid). Numerous studies support that MSC have multipotent differentiation capacity in vitro and can differentiate at least into

*Corresponding author: e-mail: jchimal@unam.mx

chondrocytes, osteocytes, and adipocytes (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Campagnoli et al., 2001; Igura et al., 2004; Rogers and Casper, 2004; Wang et al., 2006; Lei et al., 2013; Leyva-Leyva et al., 2013), three cell lineages that naturally originate in the limb bud. Also, many studies suggest that MSC may be useful in regenerative medicine and as immunomodulators (Caplan, 2007; Nauta and Fibbe, 2007; Phinney and Prockop, 2007; Yagi et al., 2010; Zhu et al., 2014). For their identification and isolation, different MSC surface antigens are used depending on the tissue of origin. In general, human MSC are positive for CD105, CD90, and CD73 markers (Dominici et al., 2006). In murine models, CD90, CD105, CD29, CD44, and Sca1 have been established as markers of adherent MSC (Kolf et al., 2007). In the limb bud, it is unknown whether undifferentiated mesenchymal cells are precursors or stem cells. Because limb bud mesenchymal cells share morphological and differentiation characteristics with MSC, we speculated that the limb bud might harbor a significant proportion of MSC, even higher than in adult tissues. The aim of this study was to determine whether resident limb bud cells express MSC markers and their relationship with chondro-, osteo-, teno-, and adipogenic key differentiation genes. To address this, we analyzed by flow cytometry the expression of different associated MSC markers, in cultured and freshly isolated limb bud cells. We demonstrated that in freshly isolated limb bud cells, there are few cells positive to MSC-associated markers. However, when we cultured limb bud cells, MSC-associated markers (specifically Sca1 and CD44) were acquired in vitro; we further demonstrated that the same phenomenon is observed in other embryo tissues such as heads and trunks. Moreover, the expression of differentiation genes of osteo-, chondro-, teno-, and adipogenic lineages were modified from the first culture. Based on these findings, we propose that probably the common immunophenotype associated with fetal and adult MSC, as well as some of their in vitro behaviors, could be partially accounted by characteristics acquired in vitro. Therefore, we propose that it is convenient to study MSC cells, their characteristics and behavior in freshly isolated cells.

Materials and methods

Animals and cell isolation

Five-week-old CD1 mice at 10.5 of gestational age were obtained from the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (Mexico City, Mexico). This research protocol was reviewed and approved by the Institutional Review Board for the Care and Use of Laboratory Animals of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Pregnant mice were individually killed by CO₂ asphyxia. Under aseptic conditions, embryos were

carefully removed from the uterus, washed in PBS, and then placed in Dulbecco's modified Eagle's medium–high glucose (DMEM-HG; Life Technologies, Carlsbad, CA). Whole E10.5 hindlimb buds, heads, or eviscerate trunks were dissected out and dissociated with 2 mg/mL collagenase type IV (Life Technologies) in Hanks Solution at 37°C for 5 min. Tissue was pipetted gently several times until a single-cell suspension was obtained. The cell suspension for each tissue was centrifuged at 1,100 rpm for 5 min; the supernatant was discarded and cells were incubated for 2 min in AKC Lysis Buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA; pH 7.4) at room temperature for 2 min. Cells were harvested independently by centrifugation and processed for flow cytometry analysis, in vitro differentiation or gene expression as a freshly isolated or cultured cells.

Cell culture

For all cell culture assays (unless otherwise indicated), cells were plated at a density of $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ in DMEM-LG medium (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Sigma–Aldrich), 1X nonessential amino acids (Life Technologies), and 1X GlutaMAX (Life Technologies) and cultured for 24 h in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37°C. At this point, the cells were considered as passage zero. Twenty-four hours after initial plating, cells were washed twice with PBS to remove non-adherent cells and the whole adherent fraction was then detached by trypsinization using 0.25% trypsin-EDTA (Sigma–Aldrich) and seeded subsequently at different passages (P1–P3) upon reaching 80–90% confluence. For experiments at different densities, the cells were plated at 1×10^4 or 2.5×10^4 cells/cm², or 4×10^4 cells/cm², and 24 h later were washed with PBS and adherent fractions were then detached by trypsinization for cytometry staining.

Flow cytometry antigen characterization

Immediately after obtaining hindlimb bud cells or trypsinization of cells at different passages (P0–P3), 1×10^6 cells were resuspended in 100 μL of FACS buffer (5 U/mL DNase, 1 mM EDTA, 1% inactivated FBS, 25 mM HEPES, PBS Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ free) and stained individually with anti-mouse CD29-APC (1:100; cat. 102215, Biolegend), Sca1-PE/Cy7 (1:300; cat. 108113, Biolegend), CD44-PE (1:300; cat. 103007, Biolegend), CD105-APC (1:100; cat. 120413, Biolegend), CD73-PE (1:300; cat. 127205, Biolegend) or CD90-FITC (1:100; cat. ab25672, Abcam) antibodies. Cell suspensions were incubated for 30 min on ice protected from the light. Unlabeled cells and isotype antibodies were used as controls to exclude nonspecific fluorescence. For

multiparametric staining, 1×10^6 cells were resuspended in 100 μ L of FACS buffer containing a mixture of Sca1 and CD44 antibodies and processed under the same conditions mentioned above. The acquisition was performed using a flow cytometer (FACS Aria, BD Biosciences). At least 20,000 labeled cells were collected and analyzed using FlowJo Software version 8.8.6. Each experiment was run by triplicate and represents a pool of approximately 200 hindlimb buds.

Real time quantitative PCR assays

All RNA extractions were performed with Trizol Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were treated with DNase I (Promega, Madison, WI, USA) during purification. Retro-transcription of total RNA was performed with SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). The expression of mRNA was analyzed using a real-time PCR system (Applied Biosystems) and quantified with SYBR green (Thermo Fisher). *Gapdh* gene was used as a normalizer and the specificity of the amplifications was analyzed by melting curve. Expression levels were evaluated relative to a calibrator according to the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ or $2^{(\Delta Ct)}$ equation. Each value on the graphics represents three independent experiments obtained under the same conditions. Each independent experiment corresponds to a pool of approximately 100 hindlimb buds. The PCR primers for each gene were designed based on its published sequence.

In vitro differentiation assays

For osteogenic and adipogenic differentiation, cells were plated at 4×10^4 cells/cm² in 35 mm plates and grown to 70 % confluence. Freshly isolated and from passages 0, 1, and 3 cells were incubated in Complete MesenCult Osteogenic Medium (StemCell Technologies) or with Complete MesenCult Adipogenic Medium (StemCell Technologies). The medium was replaced with fresh medium every 3–4 days for 15 days. For osteogenic assays, cultures were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at 4°C, and stained for 20 min in 0.2% Alizarin S-Red solution (pH 4.2). Adipogenic-induced cells were fixed in 10% formaldehyde for 30 min at 4°C and stained in Oil Red (Sigma–Aldrich) for 2 h.

For chondrogenic differentiation, micromass assays were performed according to Ahrens et al. (1977). Ten microliters containing 2×10^5 cells directly isolated from hindlimb buds or at different passages (P0, P1, or P3) were plated on the center of a 48-well plate. After attachment, wells were flooded with DMEM-HG containing 10% SFB and cultured for 3 days. The medium was replaced daily with fresh medium. On day 3, micromass cultures were fixed in Khale's fixative for 20 min and stained in 0.5% Alcian blue during 12 h.

Alizarin S red quantification

Alizarin dye quantification was performed according to (Kang et al., 2017). The stained cells for each passage were washed with distilled water and were allowed to dry. Cells were incubated with 10% v/v acetic acid at room temperature for 30 min with shaking. Each resulting solution were transferred to a tube and heated at 85°C for 10 min. Then, solutions were incubated on ice during 5 min, followed by centrifugation at 20,000g for 15 min. Neutralization was done adding 10% v/v ammonium hydroxide. The absorbance was measured at 405 nm in an Epoch Microplate Spectrophotometer (Bio-Tek).

Results

MSC-associated markers are expressed in a small proportion of non-cultured limb bud mesenchymal cells while key differentiation genes are differentially expressed at low levels

Flow cytometry assays were performed to characterize the presence of MSC-associated markers CD29, Sca1, CD44, CD105, CD90, and CD73 in freshly isolated hindlimb bud mesenchymal cells from E10.5 mouse embryos. We found that CD29 is expressed in most cells, whereas a very small proportion of total cells were positive for Sca1, CD44, CD105, CD90, and CD73 (Figure 1A). qRT-PCR of key differentiation genes *Runx2* (osteogenic), *Sox9* (chondrogenic), *Scx* (tenogenic), *Pparg* (adipogenic) and late differentiation genes *Col1a1*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Osteopontin*, and *Adiponectin* were determined. Results showed that in basal conditions, limb bud mesenchymal cells express low levels of all evaluated genes, being *Col1a1* the most abundant (Figure 1B).

The expression of Sca1 and CD44 increased in limb bud mesenchymal cells after cell culture

Having identified a small proportion of MSC-associated markers in non-cultured limb bud mesenchymal cells, we evaluated its behavior under culture conditions. A routine procedure to isolate and expand MSC was followed; freshly isolated limb bud mesenchymal cells were plated at 4×10^4 cells/cm² and the presence of MSC-associated markers in the adherent fraction was evaluated at different culture times. The first condition was passage zero (P0) corresponding to dissociated E10.5 hindlimb bud cells and 24 h seeding; the P1 and P3 corresponded to subsequently reseeded cells from P0, which reached 80–90% confluence after 48 h. Remarkably, we detected a marked increase in Sca1 (65-fold) and CD44 (56-fold) expression following plating, which was maintained through subsequent passages

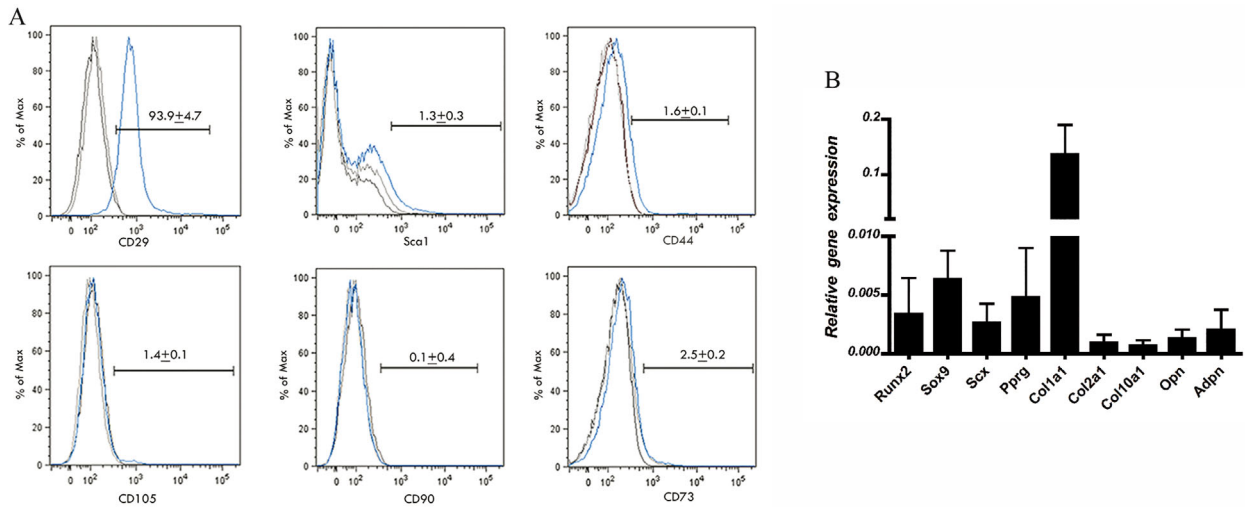


Figure 1 Non-cultured limb bud mesenchymal cells express a low percentage of MSC-associated markers and key differentiation genes of MSC-associated lineages. (A) A representative flow cytometry analysis of freshly isolated limb bud mesenchymal cells cell immunophenotype. The percentage of cells positive for CD29, Sca1, CD44, CD105, CD90, and CD73 are shown. All values represent three independent experiments (mean ± SD). (B) Real time *quantitative* PCR of RNA extracts from freshly isolated limb bud mesenchymal cells compared to *Gapdh* gene to evaluate the expression of the *Runx2*, *Sox9*, *Scx*, *Pparg*, *Col1a1*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Opn*, and *Adpn* genes.

(Table 1). These data showed that almost all seeded cells were positive for both markers, which were expressed in a few freshly isolated cells. Unexpectedly, CD29 expression was downregulated from P0 (Table 1). The number of CD105- and CD73-positive cells decreased in P0 and P1, as compared with non-cultured cells, but began to increase in P3. The number of CD90-positive cells progressively increased with plating (Table 1).

The increase of MSC-associated markers in limb bud mesenchymal cells after plating is not a result of subpopulation expansion

The increased proportion of limb bud mesenchymal cells positive for MSC-associated markers in culture, particularly Sca1 and CD44, might depend on increased cell proliferation leading to specific subpopulation expansion. To test this hypothesis, limb bud cells were dissociated and seeded at different initial densities (1, 2.5, and 4 × 10⁴ cells/cm²) to allow them to reach confluence after a different number of

cell divisions. Once cells reached 80–90% confluence after 24 h, the percentage of cells positive for Sca1 and CD44 was evaluated. We found that almost all of these cells expressed Sca1, independently of the initial culture density (Table 2). CD44 expression increased between 55 and 60% when cells were seeded at 1 × 10⁴ or 2.5 × 10⁴ cells/cm² and 71% when cells were seeded at 4 × 10⁴ cells/cm² (Table 2). These data suggested that it is unlikely that the *in vitro* acquisition of MSC-associated markers is due to an expansion of a specific subpopulation. To determine the percentage of resident limb bud cells that coexpresses Sca1 and CD44 markers, a multiparametric immunostaining in freshly isolated limb bud mesenchymal cells was done. We found that only 0.64% of limb bud mesenchymal cells before cell culture were positive for both markers (Figure 2). Thus, it is difficult to explain this sudden increase in Sca1 and CD44 expression shortly after plating. Therefore, these data suggested that the high expression of Sca1 and CD44 observed after cell plating was not due to an expansion of cell subpopulations, but rather an *in vitro* acquisition.

Table 1 Comparison of the expression of MSC-associated markers between non-cultured and cultured limb bud mesenchymal cells. For all passages, limb bud mesenchymal cells were plated at a density of 4 × 10⁴/cm². All values are expressed as a percentage and represent three independent experiments (mean ± SD).

	Sca1	CD44	CD29	CD105	CD90	CD73
Freshly isolated	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.1	93.9 ± 4.7	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.04	2.5 ± 0.2
P0	84.8 ± 8.0	90.2 ± 0.3	65.9 ± 13.9	0.7 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.4
P1	87 ± 6.4	64.9 ± 19.3	61.3 ± 9.3	0.26 ± 0.04	1.02 ± 0.3	1.01 ± 0.09
P3	78.4 ± 8.6	67.8 ± 24.7	62.4 ± 25.9	4.8 ± 0.22	6.6 ± 1.8	6.2 ± 4.6

Table 2 Expression of Sca1 and CD44 in passage 0 limb bud cells at different initial densities. All values are expressed as a percentage and represent three independent experiments (mean \pm SD).

	Sca1	CD44
1×10^4 cells/cm ²	90.2 \pm 2.9	59.6 \pm 8.3
2.5×10^4 cells/cm ²	95.2 \pm 3.2	55.3 \pm 2.0
4×10^4 cells/cm ²	88.6 \pm 4.2	71.1 \pm 3.1

Cultured mesodermal- and non-mesodermal-derived cells have a similar tendency to acquire MSC-associated markers

To investigate whether the same behavior (as in limb bud mesenchymal cells) could be observed in other mesodermal and non-mesodermal embryonic tissues, freshly isolated, and plated cells from whole heads and whole trunks of E10.5 embryos were evaluated. In freshly isolated cells from both tissues, fewer Sca1- and CD44-positive cells were observed as compared to P0 (Table 3). Notably, at P0, Sca1 expression was higher in the trunk- (mesodermal enriched) than in head- (non-mesodermal enriched) derived cells. These results showed that Sca1 and CD44 expression patterns also change in cells from whole heads and trunks when cultured, as was observed in limb bud mesenchymal cells.

In vitro differentiation ability of plated limb bud mesenchymal cells is not related to the high expression of MSC-associated markers

To assess the differentiation ability of freshly isolated limb bud mesenchymal cells, P0, P1, and P3 cells, they were induced to differentiate into chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lineages. Micromass assays showed a decrease in the chondrogenic potential of P0, P1, and P3 cells compared

with freshly isolated cells (Figure 3A). Regarding osteogenic differentiation, an increment in calcium depositions was observed from P0 through P3, as compared with freshly isolated cells (Figures 3A and 3B). Even cells from P5, P7, and P8 showed a gradual increase of osteogenic potential (data not shown). Remarkably, adipogenic differentiation was poorly induced; assays showed the presence of few cells positive for Oil Red staining in freshly isolated, P0, and P1 cells. However, there was a small increase in the cluster size of Oil Red-stained cells in the P3 condition (Figure 3A).

Common MSC isolation strategy modified the expression of early and late differentiation genes

To determine whether culture-based isolation, besides immunophenotype, leads to changes in the expression of early and late differentiation genes, the expression patterns of cultures of limb bud mesenchymal cells at P0, P1, and P3 were compared with non-cultured limb bud cells. Under basal culture conditions, induction of *Runx2* expression was evident and maintained through passages compared with freshly isolated limb bud mesenchymal cells (Figure 4). *Sox9* and *Adpn* were increased only at P0 and *Scx* at P3. *Pprg* and *Col2a* decreased since P0. Conversely, *Col1a1*, *Col10a1*, and *Opn* genes were highly overexpressed since P0 (Figure 4). These results show that, even without induction media, the subsequent plating of limb bud cells induces the expression of differentiation early and late differentiation genes.

Discussion

Although it has been proposed that fetal and adult MSC might represent stem/progenitor cells in vivo, this remains poorly defined in vivo. MSC share morphological and

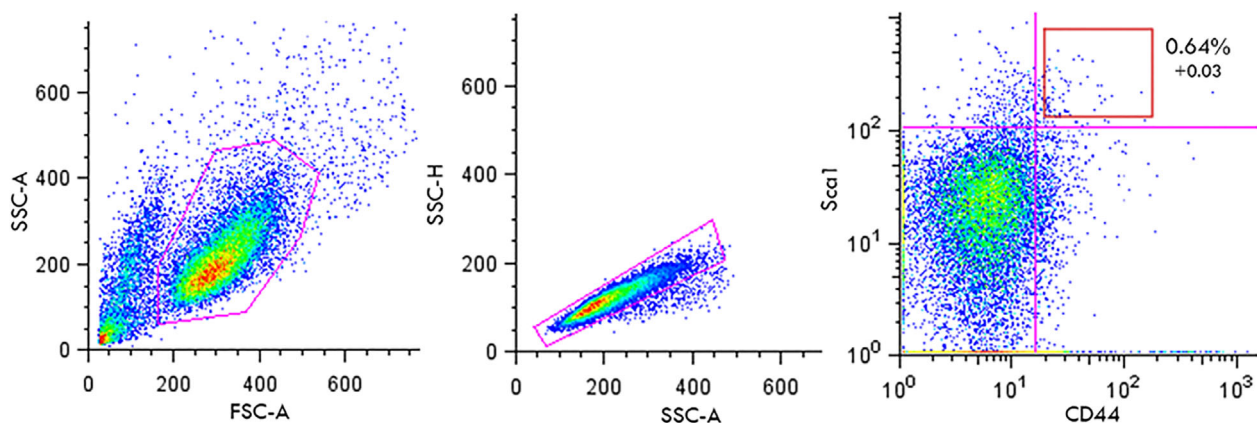


Figure 2 The percentage of coexpression of Sca1 and CD44 markers in freshly isolated limb bud mesenchymal cells. Representative dot plots of E10.5 limb bud mesenchymal cells co-expressing the Sca1 and CD44 markers. Dot plots show (A) the size (forward scatter, x-axis) versus complexity (side scatter, y-axis), (B) doublets discrimination gate (side scatter area, x-axis vs. side scatter-high), and (C) percentage of double positive cells to Sca1 and CD44 freshly isolated limb bud cells. The value represents three independent experiments (mean \pm SD).

Table 3 Expression of Sca1 and CD44 in non-cultured and plated embryo heads and trunks. All values are expressed as a percentage and represent three independent experiments (mean \pm SD).

	Sca1		CD44	
	Freshly isolated	P0	Freshly isolated	P0
Embryo heads	3.4 \pm 1.2	43.6 \pm 6.3	2.5 \pm 0.4	38.2 \pm 8.7
Embryo trunks	1.2 \pm 0.4	52.6 \pm 11	2.4 \pm 0.2	35.1 \pm 9.3

differentiation characteristics with limb bud cells. The small proportion of MSC observed in fetal and adult tissues and their ability to differentiate into distinct cellular lineages observed in the limbs led us to speculate that limb in early developing stages may harbor MSC, and perhaps even a higher proportion than in adult or fetal tissues. However, although limb bud mesenchymal cells correspond to a pool of undifferentiated and apparently homogeneous mesenchymal cells, in this work we detected that under non-cultured conditions only a small proportion of limb bud mesenchymal cells were positive for CD44, Sca1, CD29, CD73, CD105, and CD90 markers. Although limb bud cells behave *in vitro* like MSC, whether they represent MSC *in vivo* still remains to be clarified.

Furthermore, in freshly isolated limb bud mesenchymal cells, the transcripts levels of early and late lineage-specific differentiation genes were low, indicating the undifferentiated state of the limb bud mesenchymal cells. Our results showed that freshly limb bud mesenchymal cells under differentiation conditions gave rise to bone and cartilage lineages, but its adipogenic capacity was reduced. Our results

showed that osteogenic differentiation occurs in freshly cultured limb bud mesenchymal cells, suggesting that osteoprogenitor cells are found in limb bud mesenchymal cells and, that under the appropriate stimulus, can directly differentiate into osteoblasts. These data are interesting because it is well-known that limb bud mesenchymal cells can differentiate into cartilage, but bone formation occurs by endochondral ossification (Koyama et al., 1999). Previously, an osteochondroprogenitor population from long bones of fetal mice at E16.5 was identified based on the presence of the CD9 and CD73 markers within CD105⁺ cells (Singh et al., 2015). However, in the present study, low proportions of limb bud mesenchymal cells expressed CD105 and CD73. Whether these cells represent osteo- or chondro- or osteochondroprogenitor cells in the limb bud at early developing stages is unknown.

Few studies have determined the percentage of MSC-associated markers in non-cultured cells from different tissues. For example, Sca1 and CD44 markers in non-cultured cells from mouse bone marrow and fetal calvaria (Steenhuis et al., 2008; Morikawa et al., 2009; Nakatsuka et al., 2016), as well as CD44, CD105, and CD90 markers in non-cultured cells of human adipose tissue (Baptista et al., 2009), are expressed in small proportion of cells. However, the proportion of Sca1- and CD44-positive cells was highly increased when murine MSC from various tissues were cultured (Hu et al., 2003; Hua et al., 2009; Taha and Hedayati, 2010; Futami et al., 2012; Lei et al., 2013). In the present study, we observed that limb bud mesenchymal cells have a similar behavior just 24 h after being seeded; a high percentage of limb bud mesenchymal cells began to express the Sca1 and CD44 markers. The first interpretation of these

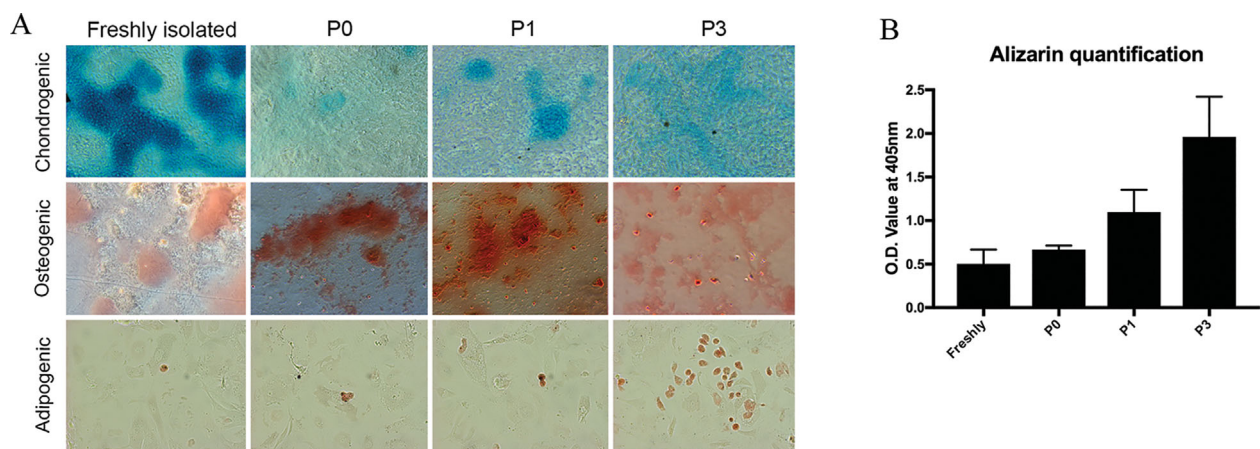


Figure 3 Comparison of in vitro differentiation capacity in chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineages cultured limb bud mesenchymal cells. (A). Representative images of in vitro differentiation experiments of freshly isolated, P0, P1, and P3 limb bud cells. Cells were stained with Alcian Blue to detect glycosaminoglycan depositions in the chondrogenic lineage; Alizarin Red S to detect mineral depositions in osteogenic differentiation or Oil Red O to detect lipid accumulation in adipogenic cultures. (B). Alizarin red S quantification through cellular passages. OD values were determined by absorbance measurement at 405 nm. Each bar represents an average of three independent experiments.

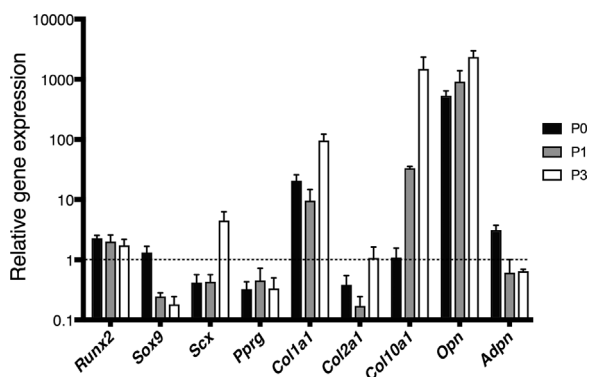


Figure 4 Comparison of the expression profiles of early and late differentiation markers in limb bud mesenchymal cells at different passages under basal culture conditions. Real time quantitative of RNA extracts from cultured limb bud mesenchymal cells at different passages to characterize the expression of the *Sox9*, *Col2a1*, *Runx2*, *Opn*, *Scx*, *Col1a1*, *Pparg*, and *Adpn* genes. For all cases, relative gene expression was normalized with non-cultured limb bud mesenchymal cells represented with the dotted line.

data was that a subpopulation of $Sca1^{+}CD44^{+}$ cells was expanded after plating. However, the published analysis of the in vivo cell cycle duration in mesenchymal cells from mouse limb buds show that the fastest cell cycle time is 11 h and that the longest is 25 h (Boehm et al., 2010). In adherent conditions, the time required for a population doubling of mouse BM-MSC is 45–68 h (Li et al., 2008), whereas adult rat adipose tissue and BM-MSC double their population on average every 39.88 and 49.9 h, respectively (Lotfy et al., 2014). The mean doubling time of human umbilical cord MSC is 24 h, and for BM it is 40 h (Lu et al., 2006). On this basis, considering that the initial cellular density and the short culture time used in the present study restricted the number of potential cell divisions. Therefore, given that the doubling time of MSC in vitro is between 24 and 68 h and that the initial proportion of freshly isolated limb bud mesenchymal cells that co-express the *Sca1* and *CD44* markers is low (0.64%), it is difficult to support a bona fide expansion of a $Sca1^{+}CD44^{+}$ subpopulation. Thus, at least seven cell divisions would be necessary to reach the observed percentage of $Sca1^{+}CD44^{+}$ by an expansion of a subpopulation, which seems unlikely. Therefore, our results suggest a rapid acquisition of MSC-associated markers in limb bud mesenchymal cells owing to culture conditions, that is, not due to an expansion of positive cells for these markers but to an induction in vitro. Interestingly, the results of the present study also demonstrated that culturing non-selected embryonic cells from trunks and heads have the same tendency to acquire *Sca1* and *CD44* from 24 h post seeding. Taken together, we suggested that it is possible that the adherent fraction of mesenchymal cells isolated from distinct tissues quickly acquire MSC-associated markers

and this acquisition is independent of proliferation rate, cellular lineage and state of differentiation and could be directly dependent on cell adhesion.

Supporting that idea, it has been reported that down-regulation of *Sca1* expression in BM-MSC occurs under non-adherent culture conditions but its expression is recovered after 5 days adherent culture (Deng et al., 2015). On the other hand, Qian et al. (2012) reported that *CD44* was acquired in mouse BM cells after in vitro culture. These authors also demonstrated that other MSC markers, such as *CD73* and *CD146*, integrins and growth factors, are overexpressed in cultured cells compared with freshly isolated cells, and their expression was maintained over subsequent passages. In pre-sorted $CD146^{-}CD34^{-}$ cells isolated from fresh BM cells, the *CD146* marker was acquired after culture (Blocki et al., 2013). In our study, although the discussion is principally focused on *Sca1* and *CD44*, we also observed a 66-fold increase in *CD90* after the limb bud mesenchymal cells were cultured, despite its initial proportion was lower (0.1%) than *Sca1* and *CD44*. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that MSC-associated markers are present in a small proportion of fresh mesenchymal cells derived from limb bud and that its MSC-associated immunophenotype is modified after cell culture.

In addition, a comparison of the expression patterns of freshly isolated and plated limb bud mesenchymal cells shows that, under basal cell culture conditions (i.e., with the maintenance media without any specific differentiation inductor), the expression of some lineage-specific differentiation markers increased while other are downregulated throughout the cell passages. This result suggests that the misregulation of the expression of lineage-specific differentiation markers could modify the ability of the cells to respond to the induction media.

It was previously published that adherent mesenchymal cells derived from 6-week human limb buds can differentiate into adipogenic, osteogenic, neurogenic-like, and hepatocyte-like lineages (Jiao et al., 2012). In that work, cells of the 5–13th passages were used, and the authors do not evaluate the in vitro differentiation capacity from freshly isolated limb cells. In contrast, in the present study, the in vitro differentiation of mesenchymal cells of early limb buds was evaluated in cells without previous culture; under these conditions a great chondro- and osteogenic differentiation capacity was observed. However, an accumulative increase in osteogenic differentiation capacity and a decrease in cartilage differentiation through passages, compared with non-cultured cells was observed. Based on these results, it is possible that the observed acquisition of *Runx2* and *Opn* in limb bud mesenchymal cells after plating, together with the decrease of *Sox9*, could favor their osteogenic instead chondrogenic differentiation, thus modifying its intrinsic differentiation capacity. Interestingly, although a significant

increase in Sca1- and CD44-positive cells was observed in limb bud mesenchymal cells since P0 (Table 1), and these markers have been associated with multipotent cells, we detected no correlation with its differentiation capacity.

Similarly, in another study, no differences are observed in clonogenic, osteogenic, and chondrogenic potential in the CD73⁺CD39⁻ and CD73⁺CD39⁺ subpopulations isolated from fresh human synovial cells. Conversely, differences in the same parameters are reported in both subpopulations obtained after the synovial cells are expanded in culture (Gullo and De Bari, 2013). In fresh BM cells, the acquisition of the CD146 marker after in vitro culture did not correlate with pericyte function in situ (Blocki et al., 2013). Also, in a recent work, lineage-tracing experiments have demonstrated that pericytes from multiple organs do not behave as progenitors or MSC in vivo (Guimarães-Camboa et al., 2017).

It has been demonstrated that there is an intrinsic heterogeneity in the MSC and their lineage commitment (Russell et al., 2010) which is reflected in the gene and CD-markers expression profile or in the differentiation potency of different sources of MSC (Lv et al., 2012). Taking it into consideration, it is possible that the isolation technique of MSC using cell culture could be the origin of the heterogeneous behavior of MSC, due to under in vitro conditions, most cells acquire a set of CD markers and in this way intrinsic subpopulations could be artificially homogenized.

Conclusion

Taken together, our findings suggest that the MSC markers observed after the cell isolation based in adherence do not entirely represent the total in vivo resident stem/progenitor cell population. Furthermore, it has not been demonstrated that the adherence of cells in a variety of tissues reflects a reliable isolation or expansion of just stem/progenitor mesenchymal cells, as has been suggested (Young et al., 1995; da Silva Meirelles et al., 2006). Additionally, the immunophenotype and changes in the expression patterns observed in cells after plating, could be associated with the in vitro behaviors that are generally observed in MSC, more than being completely reflective of an in vivo behavior. It should be considered that, although adherent cells isolated from different tissues have a great in vitro capacity to differentiate, or immunosuppression properties, or even have potential therapeutic purposes, cells with all of these characteristics could not reside *in vivo*, at least at the same proportions found in vitro. On this basis, we proposed that the naïve behavior of MSC should be characterized in freshly isolated cells from adult or fetal tissues to identify the existence of cell subpopulations in each tissue with the capacity to differentiate into specific cellular lineages.

Acknowledgments and funding

The authors thank M en C. Marcia Bustamante Zepeda, Dr. Miguel Tapia-Rodríguez from the Unidad de Microscopía, M. en C. Carlos Castellanos Barba from Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo and MVZ Georgina Díaz Herrera from Unidad de Modelos Biológicos at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for their technical assistance. The authors belong to Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa-CONACyT, México. This study was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [grant number 168642] and Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-Universidad Nacional Autónoma de México [grant numbers IN213314 and IN211117] and Fundación Miguel Alemán, A. C., México. JC M-L was the recipient of a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) as a student in the PhD program, Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [grant number IN211117].

Authors' contributions

JC M-L and JC-M conceived and designed the experiments. JC M-L performed the experiments. JC M-L and JC-M analyzed data. JC M-L and JC-M wrote the paper.

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

- Ahrens PB, Solorsh M, Reiter RS (1977) Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol* 60: 69–82.
- Baptista LS, do Amaral RJ, Carias RB, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R (2009) An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lip-oaspirate samples. *Cytotherapy* 11: 706–15.
- Blocki A, Wang Y, Koch M, Peh P, Beyer S, Law P, Hui J, Raghunath M (2013) Not all MSCs can act as pericytes: Functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem Cells Dev* 22: 2347–55.
- Boehm B, Westerberg H, Lesnicar-Pucko G, Raja S, Rautschka M, Cotterell J, Swoger J, Sharpe J (2010) The role of spatially controlled cell proliferation in limb bud morphogenesis. *PLoS biology* 8: e1000420.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396–402.
- Caplan AI (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213: 341–7.

- Chimal-Monroy J, Rodríguez-Leon J, Montero JA, Ganan Y, Macías D, Merino R, Hurler JM (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 257: 292–301.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204–13.
- Deng B, Deng W, Xiao P, Zeng K, Zhang S, Zhang H, Deng DY, Yang Y (2015) Nonadherent culture method downregulates stem cell antigen-1 expression in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med* 10: 31–6.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deng DYB, Yang Y (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–7.
- Futami I, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa N, Sadatsuki R, Muneta T, Arikawa-Hirasawa E, Sekiya I, Kaneko K (2012) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLoS ONE* 7: e35517.
- Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, Rockenstein E, Masliah E, Peterson KL, Stallcup WB, Chen J, Evans SM (2017) Pericytes of multiple organs do not behave as mesenchymal stem cells *In vivo*. *Cell Stem Cell* 20: 345–59.e5.
- Gullo F, De Bari C (2013) Prospective purification of a subpopulation of human synovial mesenchymal stem cells with enhanced chondro-osteogenic potency. *Rheumatology* 52: 1758–68.
- Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC (2003) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* 141: 342–9.
- Hua J, Yu H, Dong W, Yang C, Gao Z, Lei A, Sun Y, Pan S, Wu Y, Dou Z (2009) Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell* 41: 448–55.
- Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA (2004) Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 6: 543–53.
- Jiao F, Wang J, Dong ZL, Wu MJ, Zhao TB, Li DD, Wang X (2012) Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram* 14: 324–33.
- Kang Y, Georgiou AI, MacFarlane RJ, Klontzas ME, Heliotis M, Tsiroidis E, Mantalaris A (2017) Fibronectin stimulates the osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 11: 1929–40.
- Karsenty G, Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Geoffroy V, Amling M (1999) Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone* 25: 107–8.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9: 204.
- Koyama E, Golden EB, Kirsch T, Adams SL, Chandraratna RA, Michaille JJ, Pacifici M (1999) Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. *Dev Biol* 208: 375–91.
- Lei H, Yu B, Huang Z, Yang X, Liu Z, Mao X, Tian G, He J, Han G, Chen H, Mao Q, Chen D (2013) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from adult mouse adipose, muscle, and fetal muscle. *Mol Biol Rep* 40: 885–92.
- Leyva-Leyva M, Barrera L, Lopez-Camarillo C, Arriaga-Pizano L, Orozco-Hoyuela G, Carrillo-Casas EM, Calderón-Pérez J, López-Díaz A, Hernández-Aguilar F, González-Ramírez R, Kawa S, Chimal-Monroy J, Fuentes-Mera L (2013) Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells Dev* 22: 1275–87.
- Li Y, Zhang C, Xiong F, Yu MJ, Peng FL, Shang YC, Zhao CP, Xu YF, Liu ZS, Zhou C, Wu JL (2008) Comparative study of mesenchymal stem cells from C57BL/10 and mdx mice. *BMC Cell Biol* 9: 24.
- Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA, Hurler JM (2014) Divergent differentiation of skeletal progenitors into cartilage and tendon: Lessons from the embryonic limb. *ACS Chem Biol* 9: 72–9.
- Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M (2014) Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: A comparative study. *Int J Stem Cells* 7: 135–42.
- Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC (2006) Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91: 1017–26.
- Lv F, Lu M, Cheung KM, Leung VY, Zhou G (2012) Intrinsic properties of mesenchymal stem cells from human bone marrow, umbilical cord and umbilical cord blood comparing the different sources of MSC. *Curr Stem Cell Res Ther* 7: 389–99.
- Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y (2009) Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206: 2483–96.
- Nakatsuka R, Iwaki R, Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Fujioka T, Sasaki Y, Uemura Y, Asano H, Kwon AH, Sonoda Y (2016) Identification and characterization of Lineage(–)CD45(–)Sca-1(+) VSEL phenotypic cells residing in adult mouse bone tissue. *Stem Cells Dev* 25: 27–42.
- Nauta AJ, Fibbe WE (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499–506.
- Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 25: 2896–902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–7.

- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71–4.
- Qian H, Le Blanc K, Sigvardsson M (2012) Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein. *J Biol Chem* 287: 25795–807.
- Rogers I, Casper RF (2004) Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 893–908.
- Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC (2010) In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28: 788–98.
- Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Tabin CJ (2001) Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 128: 3855–66.
- Singh A, Lester C, Drapp R, Hu DZ, Glimcher LH, Jones D (2015) Tetraspanin CD9 and ectonucleotidase CD73 identify an osteochondroprogenitor population with elevated osteogenic properties. *Development* 142: 438–43.
- Steenhuis P, Pettway GJ, Ignelzi MA, Jr. (2008) Cell surface expression of stem cell antigen-1 (Sca-1) distinguishes osteo-, chondro-, and adipoprogenitors in fetal mouse calvaria. *Calcif Tissue Int* 82: 44–56.
- Taha MF, Hedayati V (2010) Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell* 42: 211–6.
- Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W, Wang J, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Fan T, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, Ikehara S (2006) Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells* 24: 482–93.
- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML (2010) Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 19: 667–79.
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Jr., Reagan CR, Lucas PA (1995) Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 202: 137–44.
- Zhu Y, Yang Y, Zhang Y, Hao G, Liu T, Wang L, Wang Q, Zhang G, Wei J, Li Y (2014) Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther* 5: 48.

Received 13 July 2017; accepted 3 January 2018.

IX. LITERATURA CITADA

1. Miller, C. J. & Davidson, L. A. (2013) The interplay between cell signalling and mechanics in developmental processes. *Nat Rev Genet* **14**, 733-744.
2. Salazar-Ciudad, I., Jernvall, J. & Newman, S. A. (2003) Mechanisms of pattern formation in development and evolution. *Development* **130**, 2027-2037.
3. Wolpert, L. (2008) "Finger and toes" in *The Triumph of the Embryo*. (New York: Oxford University).
4. Gilbert, S. F. (2010) "Development of the Tetrapod Limb" in *Developmental Biology* (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates) 485-510.
5. Jones, B. (2015) Genome organization: Disorder — from chromatin to limb development. *Nat Rev Genet* **16**, 378.
6. Petit, F., Sears, K. E. & Ahituv, N. (2017) Limb development: a paradigm of gene regulation. *Nat Rev Genet* **18**, 245-258.
7. Tickle, C. (2003) Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell* **4**, 449-458.
8. Sears, K. E. (2011) Novel insights into the regulation of limb development from 'natural' mammalian mutants. Studies in 'non-traditional' mammalian models with very different limb morphologies and sizes can contribute to resolving general developmental mechanisms. *Bioessays* **33**, 327-331.
9. Mackem, S. & Lewandoski, M. (2009) Limb development takes a measured step toward systems analysis. *Sci Signal* **2**, pe33.
10. Wolpert, L. (1999) Vertebrate limb development and malformations. *Pediatr Res* **46**, 247-254.
11. Wolpert, L. (2002) The progress zone model for specifying positional information. *Int J Dev Biol* **46**, 869-870.
12. Dudley, A. T., Ros, M. A. & Tabin, C. J. (2002) A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-544.
13. Delgado, I. & Torres, M. (2017) Coordination of limb development by crosstalk among axial patterning pathways. *Dev Biol* **429**, 382-386.
14. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* **195**, 231-272.
15. Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R. & Bryant, S. V. (1989) A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* **249**, 41-49.
16. Searls, R. L. & Janners, M. Y. (1971) The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev Biol* **24**, 198-213.
17. Gros, J. & Tabin, C. J. (2014) Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science* **343**, 1253-1256.
18. Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., Heath, J. K. & Tickle, C. (1995) Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* **80**, 739-746.

19. Ohuchi, H. *et al.* (1995) An additional limb can be induced from the flank of the chick embryo by FGF4. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 809-816.
20. Ohuchi, H. *et al.* (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**, 2235-2244.
21. 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**, 127-136.
22. Mahmood, R. *et al.* (1995) A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr Biol* **5**, 797-806.
23. Xu, X. *et al.* (1998) Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753-765.
24. Tabin, C. & Wolpert, L. (2007) Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* **21**, 1433-1442.
25. Summerbell, D., Lewis, J. H. & Wolpert, L. (1973) Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* **244**, 492-496.
26. Saunders, J. W. (1948) The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* **108**, 363-403.
27. Crossley, P. H. & Martin, G. R. (1995) The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-451.
28. Heikinheimo, M., Lawshé, A., Shackelford, G. M., Wilson, D. B. & MacArthur, C. A. (1994) *Fgf-8* expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev* **48**, 129-138.
29. Niswander, L. & Martin, G. R. (1992) *Fgf-4* expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* **114**, 755-768.
30. Savage, M. P. *et al.* (1993) Distribution of FGF-2 suggests it has a role in chick limb bud growth. *Dev Dyn* **198**, 159-170.
31. Laufer, E. *et al.* (1997) Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* **386**, 366-373.
32. Rodriguez-Esteban, C. *et al.* (1997) Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* **386**, 360-366.
33. Akiyama, H. *et al.* (2005) Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14665-14670.
34. Chimal-Monroy, J. *et al.* (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* **257**, 292-301.
35. Li, L., Cserjesi, P. & Olson, E. N. (1995) Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev Biol* **172**, 280-292.
36. Johnson, R. L. & Tabin, C. J. (1997) Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* **90**, 979-990.
37. Chal, J. & Pourquié, O. (2017) Making muscle: skeletal myogenesis. *Development* **144**, 2104-2122.

38. Yvernogeu, L., Auda-Boucher, G. & Fontaine-Perus, J. (2012) Limb bud colonization by somite-derived angioblasts is a crucial step for myoblast emigration. *Development* **139**, 277-287.
39. Kardon, G., Campbell, J. K. & Tabin, C. J. (2002) Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Dev Cell* **3**, 533-545.
40. 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**, 3247-3257.
41. Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Diaz-Mendoza, M. J., Garcia-Porrero, J. A. & Hurle, J. M. (2011) Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limb. *PLoS One* **6**, e24546.
42. Hall, B. K. & Miyake, T. (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* **39**, 881-893.
43. Bradley, E. W. & Drissi, M. H. (2011) Wnt5b regulates mesenchymal cell aggregation and chondrocyte differentiation through the planar cell polarity pathway. *J Cell Physiol* **226**, 1683-1693.
44. Zimmermann, B., Scharlach, E. & Kaatz, R. (1982) Cell contact and surface coat alterations of limb-bud mesenchymal cells during differentiation. *J Embryol Exp Morphol* **72**, 1-18.
45. 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 precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol* **43**, 59-67.
46. Hall, B. K. & Miyake, T. (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22**, 138-147.
47. Hargus, G. *et al.* (2008) Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Int J Dev Biol* **52**, 323-332.
48. Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V. & De Crombrughe, B. (1997) Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* **209**, 377-386.
49. Hinton, R. J., Jing, Y., Jing, J. & Feng, J. Q. (2017) Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. *J Dent Res* **96**, 23-30.
50. Sun, M. M. & Beier, F. (2014) Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* **102**, 74-82.
51. Wei, X., Hu, M., Mishina, Y. & Liu, F. (2016) Developmental Regulation of the Growth Plate and Cranial Synchondrosis. *J Dent Res* **95**, 1221-1229.
52. Kronenberg, H. M. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336.
53. Kobayashi, T. *et al.* (2002) PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* **129**, 2977-2986.
54. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A. P. (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* **13**, 2072-2086.

55. Long, F. & Ornitz, D. M. (2013) Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008334.
56. Chen, H. *et al.* (2014) Runx2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation. *J Bone Miner Res* **29**, 2653-2665.
57. Ding, M. *et al.* (2012) Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *J Cell Physiol* **227**, 3446-3456.
58. Yang, L., Tsang, K. Y., Tang, H. C., Chan, D. & Cheah, K. S. (2014) Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 12097-12102.
59. Chevallier, A., Kieny, M. & Mauger, A. (1977) Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol* **41**, 245-258.
60. Solursh, M., Drake, C. & Meier, S. (1987) The migration of myogenic cells from the somites at the wing level in avian embryos. *Dev Biol* **121**, 389-396.
61. Christ, B., Jacob, H. J. & Jacob, M. (1977) Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)* **150**, 171-186.
62. Kosher, R. A. & Rodgers, B. J. (1987) Separation of the myogenic and chondrogenic progenitor cells of undifferentiated limb mesenchyme. *Dev Biol* **121**, 376-388.
63. Tajbakhsh, S. & Buckingham, M. (2000) The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* **48**, 225-268.
64. Murphy, M. & Kardon, G. (2011) Origin of vertebrate limb muscle: the role of progenitor and myoblast populations. *Curr Top Dev Biol* **96**, 1-32.
65. Gros, J., Scaal, M. & Marcelle, C. (2004) A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev Cell* **6**, 875-882.
66. Kahane, N., Cinnamon, Y., Bachelet, I. & Kalcheim, C. (2001) The third wave of myotome colonization by mitotically competent progenitors: regulating the balance between differentiation and proliferation during muscle development. *Development* **128**, 2187-2198.
67. Bober, E., Franz, T., Arnold, H. H., Gruss, P. & Tremblay, P. (1994) Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* **120**, 603-612.
68. Rudnicki, M. A. *et al.* (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**, 1351-1359.
69. Teboul, L. *et al.* (2002) The early epaxial enhancer is essential for the initial expression of the skeletal muscle determination gene Myf5 but not for subsequent, multiple phases of somitic myogenesis. *Development* **129**, 4571-4580.
70. Umansky, R. (1966) The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb bud mesenchyme. *Dev Biol* **13**, 31-56.
71. Buckingham, M. *et al.* (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* **202**, 59-68.
72. Chevallier, A., Kieny, M. & Mauger, A. (1978) Limb-somite relationship: effect of removal of somitic mesoderm on the wing musculature. *J Embryol Exp Morphol* **43**, 263-278.

73. Pearse, R. V., Scherz, P. J., Campbell, J. K. & Tabin, C. J. (2007) A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol* **310**, 388-400.
74. Jiao, F. *et al.* (2012) Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram* **14**, 324-333.
75. Caplan, A. I. (2010) Mesenchymal Stem Cells: The Past, the Present, the Future. *Cartilage* **1**, 6-9.
76. Dominici, M. *et al.* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317.
77. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* **3**, 393-403.
78. Bratt-Leal, A. M., Carpenedo, R. L. & McDevitt, T. C. (2009) Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog* **25**, 43-51.
79. Stine, R. R. & Matunis, E. L. (2013) Stem cell competition: finding balance in the niche. *Trends Cell Biol* **23**, 357-364.
80. Shyh-Chang, N., Daley, G. Q. & Cantley, L. C. (2013) Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* **140**, 2535-2547.
81. Slack, J. M. (2008) Origin of stem cells in organogenesis. *Science* **322**, 1498-1501.
82. Caplan, A. I. (2017) Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med* **6**, 1445-1451.
83. Pittenger, M. F. *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
84. Hua, J. *et al.* (2013) Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow. *Cell Biol Int*.
85. Li, X., Zhang, Y. & Qi, G. (2013) Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* **65**, 323-334.
86. Jones, E. A. *et al.* (2006) Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* **70**, 391-399.
87. Leyva-Leyva, M. *et al.* (2013) Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells Dev* **22**, 1275-1287.
88. Baustian, C., Hanley, S. & Ceredig, R. (2015) Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors. *Stem Cell Res Ther* **6**, 151.
89. Boiret, N. *et al.* (2005) Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol* **33**, 219-225.

90. Jiang, Y. *et al.* (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49.
91. Hilkens, P. *et al.* (2013) Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* **353**, 65-78.
92. Liou, J. J., Rothrauff, B. B., Alexander, P. G. & Tuan, R. S. (2018) Effect of Platelet-Rich Plasma on Chondrogenic Differentiation of Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*.
93. Li, Q. *et al.* (2015) Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Atherosclerosis via Modulating Macrophage Function. *Stem Cells Transl Med* **4**, 1294-1301.
94. Cakiroglu, F., Osbahr, J. W., Kramer, J. & Rohwedel, J. (2016) Differences of cell surface marker expression between bone marrow- and kidney-derived murine mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **62**, 11-17.
95. Fellows, C. R., Matta, C., Zakany, R., Khan, I. M. & Mobasheri, A. (2016) Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Front Genet* **7**, 213.
96. Beeravolu, N. *et al.* (2017) Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *J Vis Exp*.
97. Kolf, C. M., Cho, E. & Tuan, R. S. (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* **9**, 204.
98. Raducanu A., Farkas Z., and Aszodi A. (2018) Beta 1 Integrin-Dependent Cell Shape Governs Mitotic Spindle Positioning In Growth Plate Chondrocytes. *Orthopaedic Proceedings* 100-B:Supp_4, 77-77.
99. Tavella, S. *et al.* (1997) Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* **110 (Pt 18)**, 2261-2270.
100. Choi, Y. A., Kim, D. K., Kang, S. S., Sonn, J. K. & Jin, E. J. (2009) Integrin signaling and cell spreading alterations by rottlerin treatment of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochimie* **91**, 624-631.
101. Sherman, L., Wainwright, D., Ponta, H. & Herrlich, P. (1998) A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev* **12**, 1058-1071.
102. Li, Y., Toole, B. P., Dealy, C. N. & Kosher, R. A. (2007) Hyaluronan in limb morphogenesis. *Dev Biol* **305**, 411-420.
103. Yu, Q., Grammatikakis, N. & Toole, B. P. (1996) Expression of multiple CD44 isoforms in the apical ectodermal ridge of the embryonic mouse limb. *Dev Dyn* **207**, 204-214.
104. Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* **52**, 189-196.
105. Nassiri, F. *et al.* (2011) Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* **31**, 2283-2290.
106. Resta, R., Yamashita, Y. & Thompson, L. F. (1998) Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* **161**, 95-109.

107. Mills, J. H. *et al.* (2008) CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9325-9330.
108. Kling, L. *et al.* (2017) Changes in CD73, CD39 and CD26 expression on T-lymphocytes of ANCA-associated vasculitis patients suggest impairment in adenosine generation and turn-over. *Sci Rep* **7**, 11683.
109. Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A. & Boyd, A. (2009) CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* **59**, 31-44.
110. Schubert, K. *et al.* (2011) Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol* **41**, 645-656.
111. Moraes, D. A. *et al.* (2016) A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* **7**, 97.
112. Stefanová, I., Horejsí, V., Ansotegui, I. J., Knapp, W. & Stockinger, H. (1991) GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* **254**, 1016-1019.
113. Holmes, C. & Stanford, W. L. (2007) Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells* **25**, 1339-1347.
114. Bradfute, S. B., Graubert, T. A. & Goodell, M. A. (2005) Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function. *Exp Hematol* **33**, 836-843.
115. Bonyadi, M. *et al.* (2003) Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5840-5845.
116. Kang, Y. *et al.* (2017) Fibronectin stimulates the osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* **11**, 1929-1940.
117. Marín-Llera, J. C. & Chimal-Monroy, J. (2018) A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture. *Cell Biol Int*.
118. Zwilling, E. (1964) Development of Fragmented and of Dissociated Limb Bud Mesoderm. *Dev Biol* **9**, 20-37.
119. 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 Tissue Res* **296**, 121-129.
120. 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. *Dev Biol* **166**, 59-72.
121. Steenhuis, P., Pettway, G. J. & Ignelzi, M. A. (2008) Cell surface expression of stem cell antigen-1 (Sca-1) distinguishes osteo-, chondro-, and adipoprogenitors in fetal mouse calvaria. *Calcif Tissue Int* **82**, 44-56.
122. Morikawa, S. *et al.* (2009) Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* **206**, 2483-2496.

123. Nakatsuka, R. *et al.* (2016) Identification and Characterization of Lineage(-)CD45(-)Sca-1(+) VSEL Phenotypic Cells Residing in Adult Mouse Bone Tissue. *Stem Cells Dev* **25**, 27-42.
124. Baptista, L. S. *et al.* (2009) An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy* **11**, 706-715.
125. Koyama, E. *et al.* (1999) Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. *Dev Biol* **208**, 375-391.
126. Singh, A. *et al.* (2015) Tetraspanin CD9 and ectonucleotidase CD73 identify an osteochondroprogenitor population with elevated osteogenic properties. *Development* **142**, 438-443.
127. Hu, Y. *et al.* (2003) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* **141**, 342-349.
128. Hua, J. *et al.* (2009) Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell* **41**, 448-455.
129. Taha, M. F. & Hedayati, V. (2010) Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell* **42**, 211-216.
130. Futami, I. *et al.* (2012) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLoS One* **7**, e45517.
131. Lei, H. *et al.* (2013) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from adult mouse adipose, muscle, and fetal muscle. *Mol Biol Rep* **40**, 885-892.
132. Boehm, B. *et al.* (2010) The role of spatially controlled cell proliferation in limb bud morphogenesis. *PLoS Biol* **8**, e1000420.
133. Li, Y. *et al.* (2008) Comparative study of mesenchymal stem cells from C57BL/10 and mdx mice. *BMC Cell Biol* **9**, 24.
134. Lotfy, A. *et al.* (2014) Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells* **7**, 135-142.
135. Lu, L. L. *et al.* (2006) Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* **91**, 1017-1026.
136. Deng, B. *et al.* (2015) Nonadherent culture method downregulates stem cell antigen-1 expression in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med* **10**, 31-36.
137. Qian, H., Le Blanc, K. & Sigvardsson, M. (2012) Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein. *J Biol Chem* **287**, 25795-25807.
138. Blocki, A. *et al.* (2013) Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem Cells Dev* **22**, 2347-2355.
139. Gullo, F. & De Bari, C. (2013) Prospective purification of a subpopulation of human synovial mesenchymal stem cells with enhanced chondro-osteogenic potency. *Rheumatology (Oxford)* **52**, 1758-1768.
140. Jia, B. *et al.* (2018) Analysis of the miRNA and mRNA involved in osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med* **16**, 1111-1120.

141. Sineh Sepehr, K. *et al.* (2018) Development of a novel explant culture method for the isolation of mesenchymal stem cells from human breast tumor. *J Immunoassay Immunochem* **39**, 207-217.
142. Ranjbaran, H. *et al.* (2018) Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran* **56**, 28-33.
143. Xin, Y. *et al.* (2013) Primary culture and multiple differentiation potency of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **29**, 1087-1093.
144. Garikipati, V. N. S. *et al.* (2018) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human fetus heart. *PLoS One* **13**, e0192244.
145. Meirelles, L. a. S. & Nardi, N. B. (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* **123**, 702-711.
146. Gurdon, J. B. (1988) A community effect in animal development. *Nature* **336**, 772-774.
147. Gurdon, J. B., Tiller, E., Roberts, J. & Kato, K. (1993) A community effect in muscle development. *Curr Biol* **3**, 1-11.
148. Chan, C. K. *et al.* (2015) Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell* **160**, 285-298.
149. Nusspaumer, G. *et al.* (2017) Ontogenic Identification and Analysis of Mesenchymal Stromal Cell Populations during Mouse Limb and Long Bone Development. *Stem Cell Reports* **9**, 1124-1138.
150. Miwa, H. & Era, T. (2018) Tracing the destiny of mesenchymal stem cells from embryo to adult bone marrow and white adipose tissue via Pdgfra expression. *Development* **145**.
151. Auda-Boucher, G. & Fontaine-Pérus, J. (1994) Differentiation potentialities of distinct myogenic cell precursors in avian embryos. *Dev Dyn* **201**, 95-107.
152. Fontaine-Pérus, J. *et al.* (1997) Mouse-chick chimera: a developmental model of murine neurogenic cells. *Development* **124**, 3025-3036.
153. Fontaine-Pérus, J. (2000) Interspecific mouse-chick chimeras. *Methods Mol Biol* **135**, 443-446.
154. Fontaine-Pérus, J. & Chéraud, Y. (2005) Mouse-chick neural chimeras. *Int J Dev Biol* **49**, 349-353.
155. Mori, J. *et al.* (2008) Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration in acid alpha-glucosidase knockout mice. *J Histochem Cytochem* **56**, 811-817.
156. Harada, K., Harada, T., Ferdous, T., Takenawa, T. & Ueyama, Y. (2015) Osteogenic cell fractions isolated from mouse tongue muscle. *Mol Med Rep* **12**, 31-36.
157. Wosczyzna, M. N., Biswas, A. A., Cogswell, C. A. & Goldhamer, D. J. (2012) Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* **27**, 1004-1017.
158. Oishi, T. *et al.* (2013) Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *PLoS One* **8**, e56641.

159. Wada, M. R., Inagawa-Ogashiwa, M., Shimizu, S., Yasumoto, S. & Hashimoto, N. (2002) Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* **129**, 2987-2995.
160. Mitchell, P. O. *et al.* (2005) Sca-1 negatively regulates proliferation and differentiation of muscle cells. *Dev Biol* **283**, 240-252.