



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**IDENTIFICACIÓN DE DOS POBLACIONES
POSITIVAS A MARCADORES DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES EN LA
EXTREMIDAD EMBRIONARIA DE RATÓN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA**

P R E S E N T A:

KAREN CAMARGO SOSA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
CIUDAD UNIVERSITARIA, 2013**



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.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	7
Características de las extremidades en los tetrápodos	7
Descripción anatómica de las extremidades.....	7
Desarrollo de la extremidad.	8
Origen celular del primordio de la extremidad.....	11
Formación de las estructuras de la extremidad: Modelos de desarrollo próximo-distal.	12
Características de las células mesenquimales del primordio de la extremidad.	14
Células troncales	15
Potencial de diferenciación de las células troncales.....	16
Células troncales mesenquimales.	18
Identificación de células troncales mesenquimales.....	21
Aproximaciones para la identificación de células troncales mesenquimales en el desarrollo.....	22
Células troncales hematopoyéticas.	25
Identificación de células troncales hematopoyéticas adultas.....	25
Identificación de células troncales hematopoyéticas embrionarias.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
OBJETIVO	31
Objetivos particulares	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Diseción de ratones hembra gestantes y de embriones.....	32
Obtención de células del primordio de la extremidad.	32
Tinción extracelular para citometría de flujo.	33
Adquisición y análisis de datos.	33
Estadística	34
RESULTADOS	35
Obtención y caracterización de las poblaciones existentes en los primordios de las extremidades de acuerdo a su tamaño y complejidad.	35
Identificación de células positivas a los marcadores CD73, CD105, CD45 y Sca-1.	36

Identificación de los inmunofenotipos CD73 ⁺ CD105 ⁺ CD45 ⁻ Sca-1 ⁻ y CD105 ⁺ Sca-1 ⁺ CD45 ⁻ en la extremidad embrionaria de ratón.....	46
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	55
APÉNDICE	56
Anticuerpos	56
Estreptavidinas	56
Soluciones	57
Citometría de flujo	58
Definición	58
Funcionamiento general del citómetro de flujo.	58
Dispersión frontal (Forward scatter).....	59
Dispersión lateral (Side scatter).	60
Gráficas de dispersión y regiones.....	60
Fluorescencia en la citometría de flujo.....	62
Compensación para el uso de múltiples fluorocromos.	63
REFERENCIAS	65

RESUMEN

Se conoce que en la extremidad en desarrollo de ratón hay células indiferenciadas de origen mesodérmico que son capaces de diferenciarse hacia distintos linajes como los son hueso, cartílago, tendones, pericondrio y dermis. Por otro lado, se han propuesto distintos inmunofenotipos para la identificación de células troncales mesenquimales (MSC), entre los inmunofenotipos, se han evaluado los marcadores CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD45⁻, Sca-1⁺/Sca-1⁻ y CD117⁻. El objetivo de este trabajo es evaluar mediante citometría de flujo la expresión de estos marcadores en primordios de extremidades embrionarias de ratón y realizar una comparación entre dos inmunofenotipos previamente reportados para la identificación de MSC con el fin de determinar si existen células durante el desarrollo de la extremidad con un perfil antigénico igual o semejante. Se identificó que en los primordios anteriores y posteriores de etapa E10.5 y E11 de ratón se expresan individualmente los marcadores CD73, CD105, CD49e, CD45 y Sca-1, no así CD90 y CD117. Posteriormente evaluamos el inmunofenotipo CD73⁺, CD105⁺, CD45⁻ y Sca-1⁻, el cual fue identificado en los primordios anteriores y posteriores de embriones de estadio E11. La expresión en conjunto de CD73 y CD105, en ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD45 y Sca-1, indica que esta población doble positiva no pertenece al linaje hematopoyético y sugiere su identidad como MSC. Por otra parte, evaluamos e identificamos en los primordios anteriores y posteriores de la extremidad embrionaria de ratón de etapa E10.5 y E11, una población CD105⁺, Sca-1⁺ y CD45⁻, la cual es probable que sea también positiva a CD49e ya que 94.4% de las células del primordio de la extremidad son positivas a este marcador, al ser evaluadas mediante citometría y sugiere su identidad como MSC.

ABREVIATURAS

A	Anterior
AER	del inglés “Apical Ectodermal Ridge”
A-P	eje Anterior a Posterior.
APC	del inglés “Allophycocyanin”
CFU-F	del inglés “Colony Forming Units-Fibroblasts”
CD	del inglés “Cluster of Differentiation”
CLP	del inglés “Common Lymphoid Progenitor”
CMP	del inglés “Common Myeloid Progenitor”
CP	Célula Progenitora.
CT	Célula Troncal.
Cy	del inglés “Cyanine”
DMEM	del inglés “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”
D-V	eje Dorsal a Ventral.
En-1	Engrailed 1.
FACS	del inglés “Fluorescente Activated Cell Sorting”
Fc γR	del inglés “Fragment Constant γ Receptor”
FGF	del inglés “Fibroblast Growth Factor”
FITC	del inglés “Fluorescein Isothiocyanate”
FSC	del inglés “Forward Side Scatter”
GFP	del inglés “Green Fluorescent Protein”
GMP	del inglés “Granulocyte and Monocyte Progenitors”
GPI	del inglés “Glicofosfatidilinositol”
HEC	del inglés “Hemogenic Endotelial Cell”
HLA-DR	del inglés “Human Leukocyte Antigens type DR”
HSC	del inglés “Hematopoietic Stem Cell”.
IACs	del inglés “Intra-Aortic-arterial Clusters”
Int1	del inglés “Integration 1”

IL7R-α	del inglés "Interleukin-7 receptor subunit alpha"
Lmx-1	del inglés "LIM Homeobox"
MCI	Masa Celular Interna.
MEP	del inglés "Megakaryocytes and Erythrocytes Progenitor"
MO	Médula ósea
MSC	del inglés "Mesenchymal Stem Cell"
MPP	del inglés "Multipotential Progenitors"
NK	del inglés "Natural Killer"
P	Posterior
PBS	del inglés "Phosphate Buffered Saline"
P-D	eje Proximal a Distal.
PDGFRα	del inglés "Platelet Derived Growth Factor Receptor- α "
PE	del inglés "Phycoerythrin"
PerCP	del inglés "Peridinin Chlorophyl"
PFA	Paraformaldehido
Sca-1	del inglés "Stem Cell Antigen-1"
SFB	Suero Fetal Bovino
SSC	del inglés Side Scatter
SHH	del inglés "Sonic Hedgehog"
Sox-9	del inglés "Sry-related HMG box"
TGF-β	del inglés "Transforming Growth Factor Beta"
V-CAM	del inglés "Casular Cell Adhesion Molecule"
YS	del inglés "Yolk Sac"
Wnt	de la combinación de los nombres de los genes que codifican a las proteínas Wntless en <i>D. melanogaster</i> e Int1 en <i>M. musculus</i> .

INTRODUCCIÓN

Características de las extremidades en los tetrápodos

Existe una gran diversidad de formas de las extremidades, las cuales están estrechamente relacionadas a la adaptación que poseen los diferentes organismos a su ambiente. Sin embargo, durante su formación todas ellas siguen un patrón en común de desarrollo. En el embrión, podemos distinguir un par de extremidades anteriores y un par de posteriores, siempre en una posición definida de manera equidistante a la línea media del cuerpo del embrión.

Aun cuando en etapas adultas la morfología de las extremidades entre especies es muy diversa, se pueden identificar tres regiones anatómicas comunes (Fig.1a) determinadas por los elementos esqueléticos que lo conforman; en la parte más proximal, se encuentra el estilópodo que está formado por el húmero en las extremidades anteriores y el fémur en las extremidades posteriores. En la región media, se encuentra el zeugópodo el cual está formado por el radio y la ulna en las extremidades anteriores y la tibia y la fíbula en las posteriores. Finalmente, en la parte más distal, se encuentra el autópedo, en el cual, en las extremidades anteriores, se localizan los metacarpos, carpos y falanges; en la posteriores los metatarsos, tarsos y falanges (Fig. 1a y 1b; Mariani & Martin, 2003).

Descripción anatómica de las extremidades

Se pueden observar tres ejes anatómicos (Fig. 2a) en las extremidades: 1) El eje próximo-distal (P-D), en donde el lado proximal es la región más cercana a la línea media del cuerpo y el lado distal es la punta de los dedos. 2) El eje antero-posterior (A-P), en el cual el lado anterior corresponde al dedo pulgar y el lado posterior al dedo meñique. 3) El eje dorso-ventral (D-V), en el que la parte palmar es el lado ventral mientras que los nudillos se encuentran en el lado dorsal.

Las extremidades están constituidas por los elementos esqueléticos, los tendones, los ligamentos y los tejidos conjuntivos, todos éstos son originados por las células de la placa lateral del mesodermo; mientras que, los músculos y las células endoteliales vasculares tienen su origen desde el mesodermo somítico. Los nervios son provenientes de las ramas ventral y dorsal primarias de los nervios espinales. Las extremidades, están recubiertas por piel que consiste de epidermis que se origina del ectodermo y la dermis, que proviene del linaje mesodérmico junto con algunos tipos celulares formados por la cresta neural.

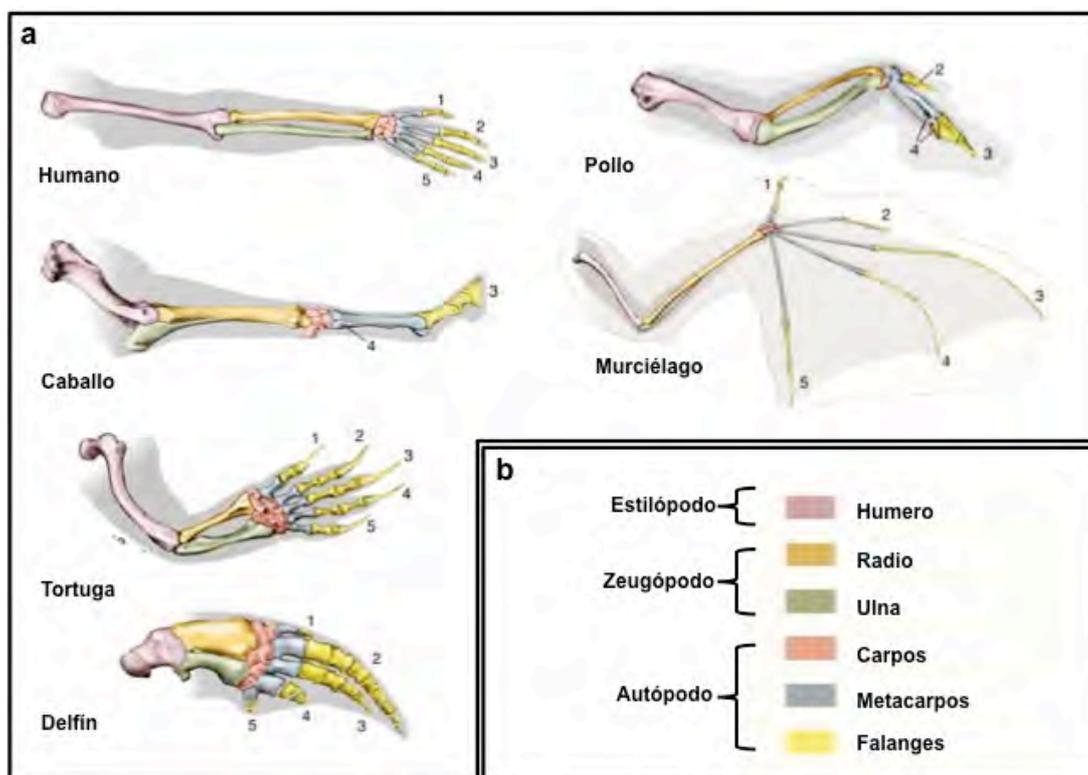


Figura 1. Características de las extremidades de vertebrados. a) Homología de las extremidades anteriores, los números indican la identidad digital. **b)** Regiones anatómicas: estilópodo, zeugópodo y autópodo. Modificado de Encyclopaedia Britannica. Imagen No. 141483310. Universal Images Group. (Sitio web accesado el 10 de septiembre de 2013).

Desarrollo de la extremidad

El desarrollo de las extremidades inicia con la formación de los primordios, éstos se derivan siempre en una posición definida del mesénquima lateral (Fig.

2b). En el ratón (*Mus musculus*) los primordios, que consisten de células ectodérmicas que envuelven a un grupo de células mesenquimales (Fig. 2c), que al diferenciarse generan los distintos tipos celulares que conforman la extremidad (Wachtler et al., 1981). Los primordios anteriores se forman entre las somitas 7 y 12 y los posteriores entre las somitas 23 y 28 (Fig. 2b; Wanek et al., 1989).

En el primordio de la extremidad se encuentran regiones específicas que dirigen la formación de patrones de diferenciación celular a lo largo de los tres ejes anatómicos:

En el eje próximo-distal (P-D) (Fig. 2d), el primordio crece direccionado por la cresta ectodérmica apical (referidas en este manuscrito como AER, del inglés "Apical Ectodermal Ridge"), un epitelio especializado que corre a lo largo del borde más distal del primordio (Fig. 2e) y mantiene en estado indiferenciado y proliferativo a la células subyacentes a ella mediante las vías de señalización inducidas por las proteínas Wnt (de la combinación de los nombres de los genes que codifican a las proteínas Wingless en *D. melanogaster* e *Int1* en *M. musculus*) y FGF (del inglés "Fibroblast Growth Factor"; Fernandez-Teran & Ros, 2008; Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2002; Ten-Berge et al., 2008). El crecimiento P-D resulta en la formación del estilópodo, zeugópodo y autópedo (Saunders, 1948).

En el eje antero-posterior (A-P) (Fig. 2d) se encuentra la zona de actividad polarizante (Fallon & Crosby, 1975), compuesta por un conjunto de células mesodérmicas localizadas en el borde posterior del primordio, que intervienen en la formación de patrones (Te-Welscher et al., 2002) al secretar y establecer a lo largo del eje A-P un gradiente de la proteína morfogénica SHH (del inglés "Sonic hedgehog"; Riddle et al., 1993) cuya función está involucrada en el control del número de dígitos y la identidad digital. En la parte posterior del primordio, la forma activa de Gli3 restringe la actividad de SHH.

En el eje dorso-ventral (D-V) (Fig. 2d) el ectodermo que recubre al primordio, dirige la formación del patrón dorso ventral, el cual se define mediante la expresión restringida de genes: la región dorsal se caracteriza por la expresión

de Lmx-1b (Chen et al., 1998) y la región ventral por la expresión de En-1 (Loomis et al., 1996). El establecimiento de estos dominios genera un patrón bien definido de músculos y tendones que tienen una organización dorso-ventral.

El establecimiento de patrones a lo largo de los tres ejes anatómicos es imprescindible para la correcta formación de estructuras tan complejas como los son las extremidades de los vertebrados.

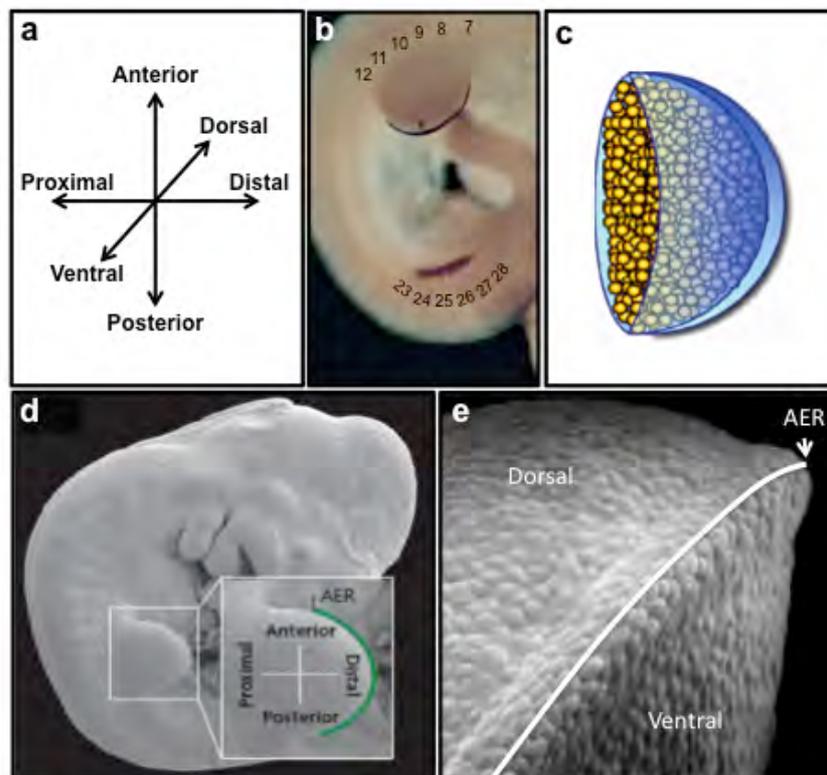


Figura 2. Primordio de la extremidad de ratón. **a)** Ejes anatómicos: Próxim-distal, antero-posterior y dorso-ventral **b)** Los primordios anteriores se forman entre las somitas 7 y 12 y los posteriores entre las somitas 23 y 28. **c)** Constitución del primordio: en amarillo las células mesenquimales y en azul el ectodermo. **d)** Ejes próximo-distal y antero-posterior. **e)** Eje dorso-ventral y AER. (Modificados de Lewandoski et al., 2000; Fernandez-Teran & Ros, 2008; Zeller et al., 2009).

Origen celular del primordio de la extremidad

Los tipos celulares mesodérmicos de la extremidad provienen de dos fuentes: la placa lateral del mesodermo y el miotomo (Fig.3a).

La mayoría de los tipos celulares que conforman la extremidad, provienen de células derivadas de la placa lateral del mesodermo, cuyo crecimiento en dirección lateral (Fig. 3b; Wachtler et al., 1981) forma el primordio de la extremidad y en dónde se establecen los centros de señalización distribuidos a lo largo de los tres ejes anatómicos (P-D, A-P y D-V), estableciendo la formación de patrones de diferenciación celular en el mesénquima del primordio.

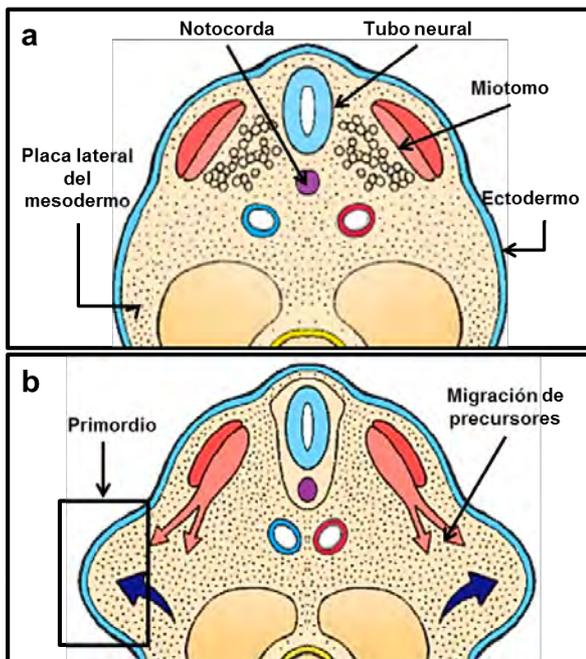


Figura 3. Origen celular del primordio de la extremidad. a) Esquema de un corte transversal previo a la formación del primordio de la extremidad. b) Un engrosamiento generado en la placa lateral del mesodermo prolifera en dirección lateral rodeado por ectodermo. Los precursoros musculares y endoteliales vasculares originados en el miotomo migran dentro del primordio de la extremidad. (Modificado de Schoenwolf, 2009).

Por su parte, los precursoros musculares y endoteliales vasculares son originados en la parte epitelial de las somitas (miotomo), estos precursoros migran dentro del mesénquima del primordio (Fig. 3b) para posteriormente diferenciarse en el campo de la extremidad. Dentro de esto, las células reciben señales para realizar una compleja red de músculos y vasculatura, respectivamente (Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977; Kardon, 1998).

Se ha propuesto (Tabin & Wolpert, 2007), que las células mesenquimales derivadas del mesodermo lateral son células indiferenciadas y multipotentes

que al recibir señales de diferenciación, tienen la capacidad de diferenciarse en cartílago, pericondrio, tejido conjuntivo muscular, de tendones, ligamentos y dermis.

En 2007, Pearse y colaboradores, identificaron mediante una metodología que permite realizar el seguimiento de las células descendientes de una sola célula mesenquimal desde un estadio temprano. Los resultados de ese trabajo (Pearse et al., 2007), muestran que de manera clonal, algunas células del mesénquima del primordio son capaces de dar origen hasta cinco diferentes tipos celulares incluyendo cartílago, pericondrio, tendones, tejido conectivo muscular y dermis (Fig.4a y 4b; Pearse et al., 2007), lo que sugiere su estado indiferenciado y multipotente.

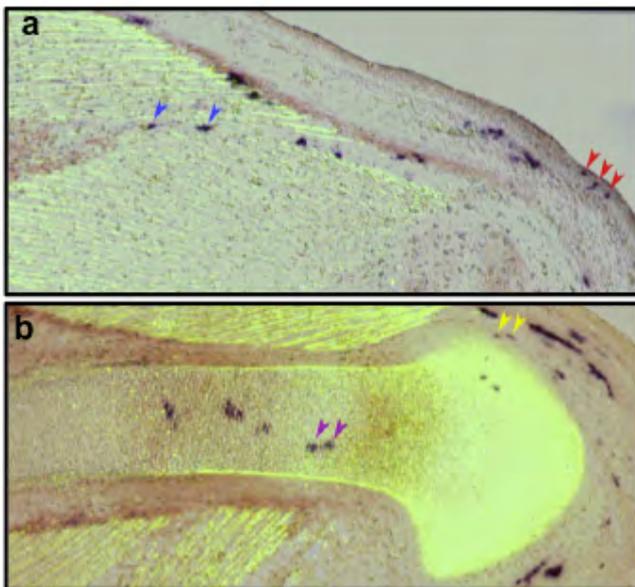


Figura 4. La descendencia de una sola célula puede contribuir a múltiples linajes. Todas las cabezas de flecha indican colonias descendientes de una sola célula **a)** Tejido conjuntivo muscular, azul y dermis, rojo. **b)** Cartílago, morado y pericondrio, amarillo. (Pearse et al. 2007).

Formación de las estructuras de la extremidad: Modelos de desarrollo próximo-distal

Los mecanismos mediante los cuales las células del mesénquima adquieren su patrón espacial y diferenciación para producir la compleja anatomía característica de las extremidades, no han sido completamente descritos. Sin embargo, se ha propuesto que la zona más distal del mesénquima del primordio, zona indiferenciada (Tabin & Wolpert, 2007), se encuentra en un

estado proliferativo (Fig. 5a) por efecto de las señales de las vías de FGF y Wnt provenientes de la AER, ambas vías interactúan para coordinar la proliferación y la especificación del destino celular durante el desarrollo de la extremidad (Ten-Berge et al., 2008). Conforme el primordio de la extremidad crece, las células más proximales de la zona indiferenciada, espacio denominado como frente de diferenciación, se alejan del dominio de la AER, y responden ante los estímulos de diferenciación siguiendo un programa de especificación próximo-distal, basado en la expresión de genes específicos para cada segmento (Fig. 5b; Tabin & Wolpert, 2007; Ten-Berge et al., 2008). Debido al crecimiento del primordio por efecto de la proliferación, el centro del mesénquima se aleja del dominio de la señales de ambas vías, por lo que deja de proliferar e inicia un proceso de diferenciación (Fig. 5b).

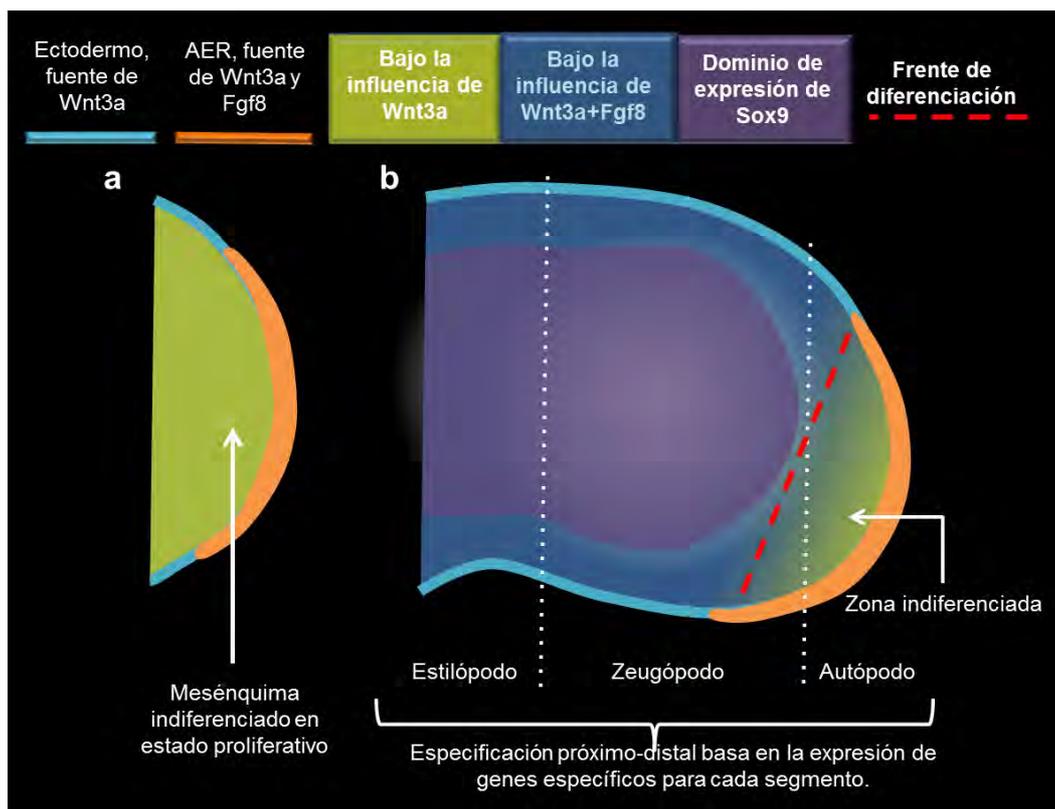


Figura 5. Modelos de desarrollo próximo-distal. a) Inicialmente todo el mesénquima del primordio se encuentra bajo la influencia de Wnt3a y Fgf8 manteniéndose indiferenciado y proliferativo. b) Conforme el primordio crece, sólo la parte más distal, la zona indiferenciada, se mantendrá bajo la influencia de Wnt3a y Fgf8. Las células más proximales de la zona indiferenciada, frente de diferenciación, son susceptibles a señales de especificación y diferenciación. (Esquema basado en los modelos propuestos por Tabin & Wolpert, 2007; Ten-Berge et al., 2008).

Características de las células mesenquimales del primordio de la extremidad

Las células mesenquimales del primordio de la extremidad dan origen a todos los tejidos mesodérmicos de la extremidad con excepción del músculo y la vasculatura los cuales provienen de precursores no diferenciados generados en el miotomo. El resto de los tejidos se derivan de un grupo de células indiferenciadas, multipotentes y proliferativas provenientes de la placa lateral del mesodermo que se especifican y diferencian dentro del primordio de la extremidad.

Las células mesenquimales provenientes de la placa lateral del mesodermo presentan características semejantes a poblaciones celulares identificadas en individuos adultos. Estas poblaciones adultas también se encuentran indiferenciadas y tienen el potencial de generar uno o más tipos celulares y por sus características se les ha denominado células troncales (Till & McCulloch, 1980; Caplan, 1994). El potencial de diferenciación que presentan las células mesodérmicas del primordio es semejante al de las células troncales mesenquimales (descritas en el siguiente apartado).

Células troncales

Una célula troncal puede ser definida como una célula *indiferenciada* con *potencial de diferenciación* y la capacidad de *auto renovarse*. Se puede dividir de manera simétrica (Fig. 6b) o asimétrica (Fig. 6c). En el primer caso las dos células resultantes retienen su carácter indiferenciado mientras que en el segundo caso sólo una célula se mantiene indiferenciada mientras que la segunda es capaz de responder ante uno o más estímulos de diferenciación. Esto implica que siempre hay un reservorio de células troncales (auto renovación), al tiempo que se genera un grupo de células receptoras a señales de diferenciación (potencial de diferenciación), las cuales primero amplifican su número mediante proliferación y posteriormente inician un proceso de diferenciación (Morrison et al., 1997).

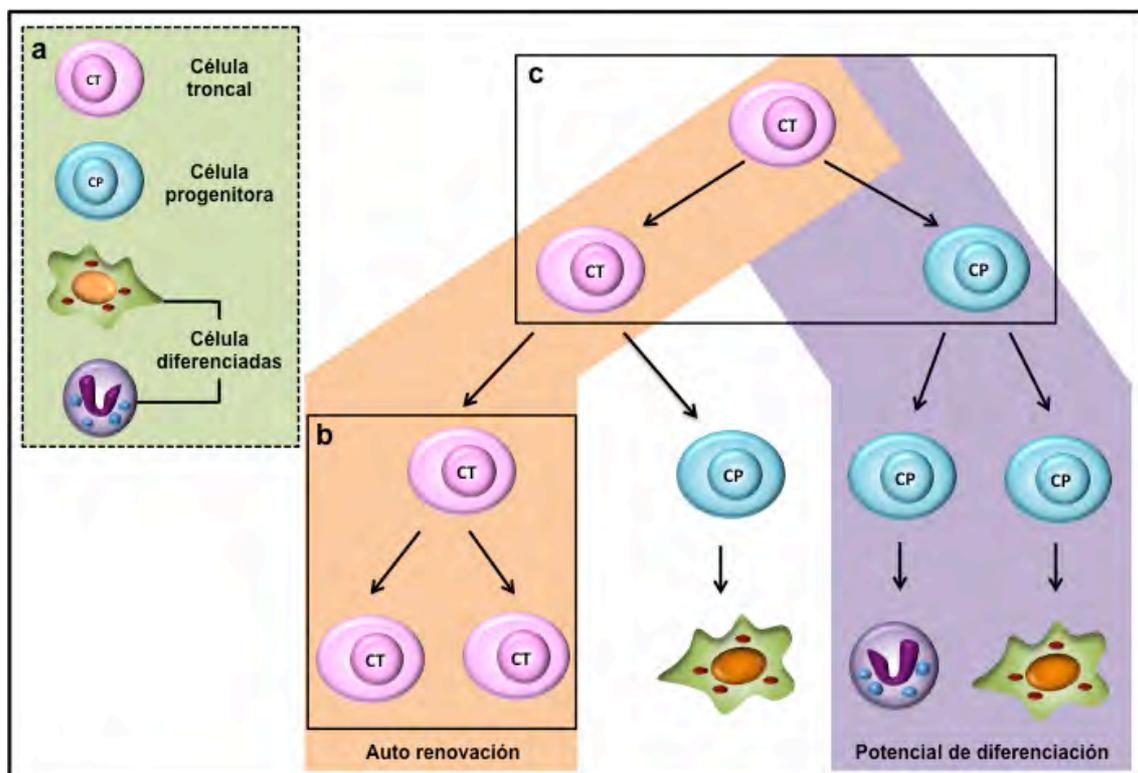


Figura 6. Características de las células troncales. a) Célula troncal (CT), célula progenitora (CP) y células diferenciadas. b) División simétrica. c) División asimétrica. Auto renovación de una célula troncal, resultado de su división simétrica y/o asimétrica (fondo naranja). Una célula troncal tiene el potencial de generar células diferenciadas al dividirse simétricamente generando una célula progenitora la cual prolifera limitadamente amplificando su número y posteriormente iniciando su diferenciación (fondo morado).

Potencial de diferenciación de las células troncales

Las células troncales, presentan diferentes niveles de potencial de diferenciación, el cual puede ser distinto cuando se evalúan en ensayos *in vitro* o dentro del sistema biológico al que pertenecen.

En diversos tejidos adultos, se han identificado células unipotentes, que generan únicamente un tipo celular, un ejemplo de ellas son las espermatogonias, un tipo de células troncales unipotentes capaces de generar espermatozoides durante la vida adulta (Fig. 7a). De igual manera, en las criptas de las vellosidades intestinales, hay células troncales unipotentes encargadas de compensar el desgaste celular de este tejido (Oatley & Brinster, 2008).

Por otra parte, están las células troncales multipotentes que son capaces de dar origen a varios linajes dentro de una misma capa germinal (Fig. 7b). Un ejemplo, son las células troncales hematopoyéticas (referidas en este manuscrito como HSC, del inglés "Hematopoietic Stem Cells"), estas células pueden dar lugar a todos los linajes hematopoyéticos, tanto del linaje linfóide como el linaje mielóide (Till et al., 1964; Till & McCulloch, 1980). De manera semejante, las células troncales mesenquimales (referidas en este manuscrito como MSC, de inglés Mesenchymal Stem Cells), son células multipotentes que se encargan de la reposición tisular de la médula ósea mediante la generación de células capaces de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos, adipocitos y tejido conjuntivo estromal (Caplan, 1994).

En un nivel de mayor potencialidad, están las células troncales pluripotentes, que pueden dar origen a todos los tipos celulares que conforman un embrión. Durante el desarrollo, las células de la masa celular interna (Fig. 7c), son capaces de formar a todos los tipos celulares de un embrión (Evans & Kaufman, 1981), sin embargo, se han identificado fuentes que generan poblaciones celulares que en ensayos *in vitro* muestran ser pluripotentes, tales como; las células de carcinoma embrionario (Kleinsmith & Pierce, 1964), las células germinales embrionarias (Donovan & de Miguel, 2003), las células derivadas

de epiblasto (Tesar et al., 2007; Brons et al., 2007), y por último, las células pluripotentes inducidas (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Debido a su capacidad de formar tanto a los tejidos embrionarios como a los extraembrionarios de un organismo, en 1877, el biólogo alemán Ernst Haeckel consideró al cigoto como célula troncal totipotente (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). De acuerdo al concepto actual de troncalidad, una célula troncal totipotente, además de general tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios, debe ser capaz de auto renovarse.

El cigoto y las blastomeras generadas durante las tres primeras segmentaciones, tienen la capacidad de generar tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios al ser separadas mecánicamente. Este fenómeno ocurre porque los factores maternos que inician del desarrollo del organismo son distribuidos en las primeras ocho blastomeras generadas en la segmentación. Posterior a esto, las blastomeras generadas ya no presentan totipotencialidad, lo cual indica que no se trata de un proceso de auto renovación, por lo tanto, el cigoto no puede ser considerado como una célula troncal pero si una célula totipotente.

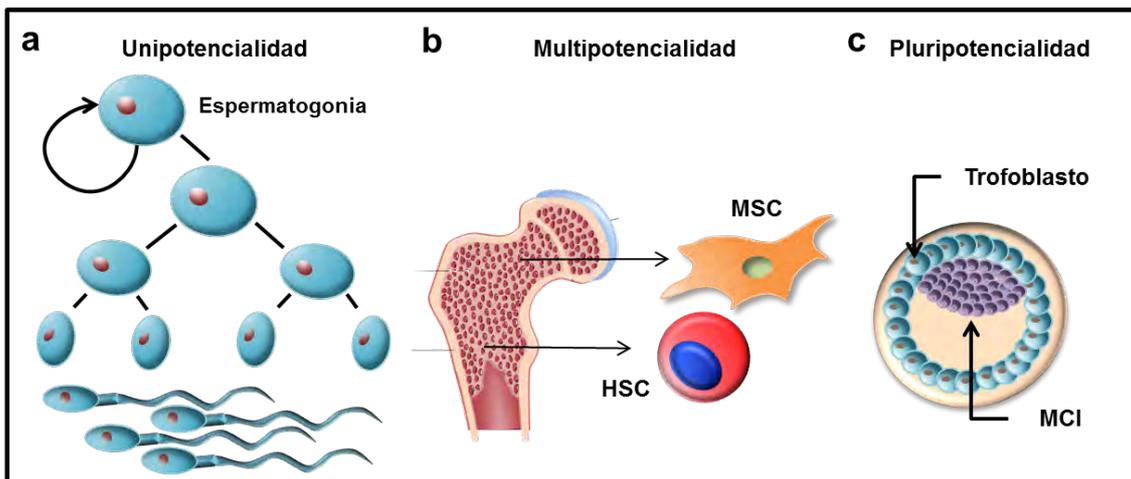


Figura 7. Potencialidad de las células troncales. a) Las espermatogonias son células unipotentes que generan a los espermatozoides durante la vida adulta. b) Las células troncales mesenquimales y hematopoyéticas (MSC y HSC) son células multipotentes que generan varios tipos celulares del linaje mesodérmico. c) La masa celular interna (MCI) está compuesta por células pluripotentes que tienen el potencial de generar todos los tipos celulares de las tres capas germinales. (Modificados de Spradling et al., 2001; Ho & Crabtree, 2010).

Células troncales mesenquimales

En 1966, Friedenstein y Petrokoca describieron una población celular derivada de MO capaz de formar tejido óseo heterotópico (que está situado en un lugar anormal) *in vivo* (Friedenstein et al., 1966). Posteriormente, se demostró que estos “progenitores osteogénicos” con adherencia al plástico, eran capaces de diferenciarse también a condrocitos y adipocitos en condiciones *in vitro*, tanto a nivel poblacional como clonal (Friedenstein et al., 1970). De acuerdo a las nuevas observaciones, esta población celular fue reclasificada primero como “Células Troncales Estromales” (Owen, 1988) y posteriormente como “Células Troncales Mesenquimales” (Caplan, 1994).

Las MSC se caracterizan por crecer en colonias de tipo fibroblastoide, (referido en este manuscrito como CFU-F, del inglés "Cell Forming Units-Fibroblasts"; Friedenstein et al., 1970). En aspirados de médula ósea humana se encuentran en una frecuencia de entre 1 y 20 CFU-F por cada 100 000 células mononucleares sembradas (Simmons et al., 1991).

Las MSC se encargan de la reposición celular de la médula ósea a través de la generación de células capaces de diferenciarse en condrocitos, osteoblastos, adipocitos y tejido conectivo estromal (Fig. 8; Stappenbeck & Miyoshi, 2009), así como también contribuyen a la liberación de factores solubles que actúan de manera parácrina promoviendo la reparación tisular (Galli et al., 2010; Pittenger et al., 1999; Sorrell et al., 2009; Cassiede et al., 1996).

Por otra parte, se ha sugerido que las MSC tiene la capacidad de dar origen a linajes no esperados (Fig. 8) como neuronas (Dezawa et al., 2004), células β pancreáticas (Santos et al., 2010), hepatocitos (Lee et al., 2004), células epiteliales de pulmón (Kotton et al., 2001), miofibroblastos, células del epitelio pigmentado de la retina, células epiteliales de piel, células de los conductos sebáceos y células epiteliales tubulares de riñón (Phinney & Prockop, 2007; Prockop, 2009). Sin embargo, la diferenciación hacia estos linajes permanece controversial, debido a la heterogeneidad que pudiera existir de las poblaciones

evaluadas en estos ensayos, así como los protocolos de diferenciación utilizados.

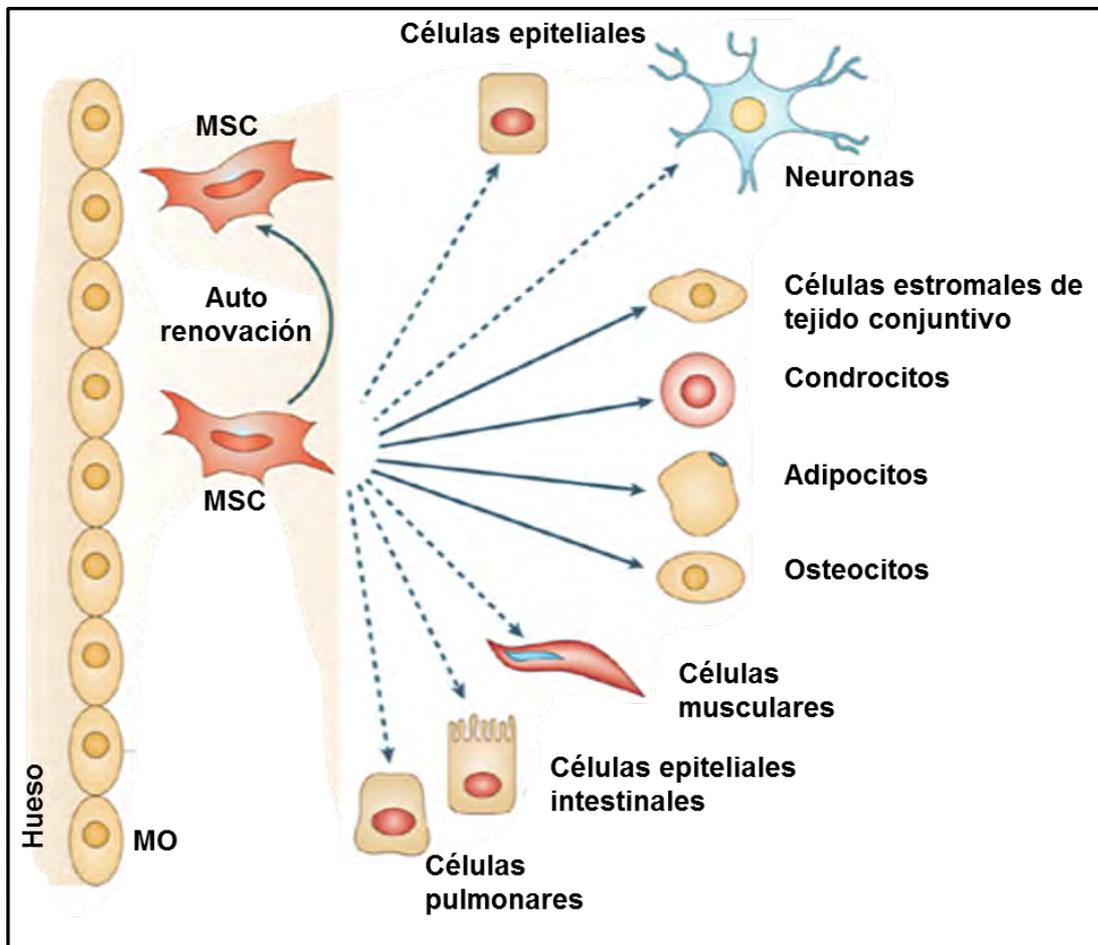


Figura 8. Características de las células troncales mesenquimales. En la médula ósea (MO), las MSC tienen la capacidad de auto renovarse (línea curva) y diferenciarse a linajes mesodérmicos (flechas sólidas). En ensayos *in vitro* se ha reportado su capacidad para diferenciarse en tipos celulares no esperados de los linajes endodérmico y ectodérmico (flechas punteadas). (Modificado de Uccelli et al. 2008).

Debido a su multipotencialidad, las MSC son una opción terapéutica para promover la reparación o regeneración de tejidos mesenquimales dañados (Stappenbeck & Miyoshi, 2009). Adicionalmente, se les han atribuido propiedades inmunosupresoras, por lo que han sido utilizadas en el tratamiento

de enfermedades mediadas por el sistema inmune, incluyendo la enfermedad injerto contra hospedero y sepsis (Uccelli et al., 2008).

Algunos estudios sugieren que dentro de la médula ósea, las MSC se localizan mayoritariamente en la región perivascular (en las paredes de la red vascular sanguínea de la médula ósea), y en menor frecuencia en el endosteo, que comprende de una delgada capa de células que recubre la cavidad medular de un hueso (Fig.9 ; Méndez-Ferrer et al., 2010). En conjunto con otras células, ya sea de manera directa o a través de la generación de células estromales y osteoblastos, las MSC contribuyen a la formación del nicho en el que residen las HSC (Ehninger & Trumpp 2011).

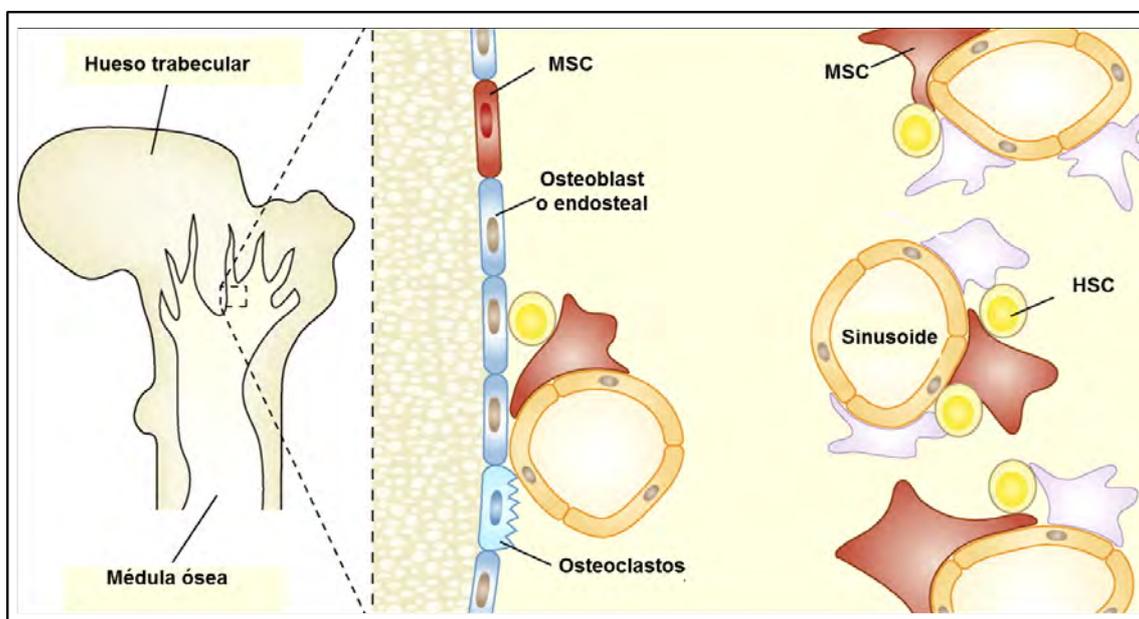


Figura 9. Localización de los nichos de MSC en la médula ósea. Las MSC se encuentran mayoritariamente en las paredes de la red vascular sanguínea de la médula ósea, en la zona perivascular y en menor frecuencia en la zona que recubre la cavidad medular, el endosteo. (Modificado de Ehninger & Trumpp, 2011).

En otros tejidos como el muscular, adiposo (Zuk et al. 2002) así como en el cartílago, hueso (Nöth et al., 2002) y tejidos extraembrionarios (Kern et al., 2006; In't Anker et al., 2004) se han encontrado células que en ensayos *in vitro* se mantienen indiferenciadas, proliferan formando CFU-F y son multipotentes. Tanto a las células multipotentes encontradas en médula ósea, como las

identificadas en tejidos mesodérmicos que tengan la capacidad de auto-renovarse, se les ha denominado células troncales mesenquimales.

Identificación de células troncales mesenquimales

La identificación y obtención de MSC supone diversas dificultades debido a su baja frecuencia en cualquiera de sus fuentes y la presencia de otras poblaciones con distintos potenciales de diferenciación.

Inicialmente, las MSC eran aisladas por su adherencia al plástico, sin embargo, mediante este procedimiento se obtienen poblaciones heterogéneas. Para evitar esta contaminación se implementaron estrategias como cambios frecuentes de medio de cultivo durante un tiempo prolongado. Este procedimiento requiere de al menos varias semanas, lo cual modifica la naturaleza de las MSC, dificultando así la descripción in vitro de su identidad, función fisiológica y propiedades biológicas.

Actualmente, muchos trabajos están dirigidos hacia el desarrollo de un protocolo detallado para el aislamiento selectivo de una población homogénea de MSC, basado en la expresión de proteínas que son empleadas como marcadores de esta población. Para las MSC, las estrategias utilizadas están basadas en la evaluación de un conjunto de marcadores positivos de tipo endotelial y mesenquimal, mientras que se excluyen células con un inmunofenotipo hematopoyético.

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular, estableció los criterios mínimos para definir en humanos a una población celular como MSC. Se tomó en consideración, además de su adherencia al plástico, la formación de CFU-F y tener el potencial condrogénico, osteogénico y adipogénico. Adicionalmente, la población a evaluar debe presentar la expresión conjunta de las proteínas CD73, CD90, CD105 (marcadores positivos) y carecer de la expresión de las proteínas CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a y HLA-DR (marcadores negativos; Dominici et al., 2006), todas ellas, marcadores del linaje

hematopoyético, con el fin de excluir a las células hematopoyéticas que se encuentran en la MO.

Estos marcadores fueron propuestos como resultado de un consenso basado en los trabajos publicados, aunque se conocen una gran variedad de otros marcadores tanto positivos como negativos que han sido identificados y usados por otros investigadores (Calloni et al. 2013). No obstante, hay diferencias entre los protocolos empleados en la evaluación de los marcadores.

Hasta el momento poco se sabe sobre la función in vivo de estos marcadores. Se ha descrito que el antígeno CD105 (Barry et al., 1999), también conocido como endoglina, es el receptor de TGF- β III, el cual potencialmente, juega un papel en la señalización de TGF- β durante la diferenciación condrogénica de las MSC. Por su parte CD73, es una 5'-ectonucleotidasa está involucrada en la migración de las MSC (Ode et al., 2011) y en la modulación de las MSC sobre el sistema inmune adaptativo (Barry et al., 2001). La función de CD90 (Thy-1) en las MSC no ha sido identificada.

En ratón, se han evaluado diferentes marcadores. Entre los positivos destacan CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, Sca-1, V-CAM y PDGFR α , mientras que se han empleado como marcadores negativos CD45, CD11b, CD117, CD31, CD106, CD135 y TER-119 (Morikawa et al., 2009; Nadri & Soleimani, 2007; Sung et al., 2008).

Aproximaciones para la identificación de células troncales mesenquimales en el desarrollo

Una gran variedad de estudios indican que las MSC derivadas de médula ósea o de otros tejidos adultos, son las de mayor accesibilidad y pueden expandirse rápidamente *in vitro*. Sin embargo, tienen como limitante que conforme a la edad, su cantidad y potencial de diferenciación decrece (Alessandri et al., 2004). En contraparte, las MSC fetales son menos inmunogénicas y tienen un mayor potencial de diferenciación (Todorov et al., 2010). No obstante, la mayoría de los trabajos reportados son de MSC derivadas de células de cordón

umbilical y de sangre de cordón umbilical, placenta y del fluido amniótico de etapas perinatales (In't Anker et al., 2004; Kestendjieva et al., 2008; Lee et al., 2004). Hasta el momento poco se ha descrito sobre la presencia de MSC en etapas tempranas del desarrollo.

En 2012 se describió (Jiao et al., 2012) una población de células pluripotentes humanas derivada de los primordios de las extremidades de un feto de seis semanas. Las células identificadas, además de diferenciarse a linajes mesodérmicos, pueden generar un tipo celular endodérmico y uno ectodérmico. En este trabajo se expandieron células adherentes y posteriormente se evaluó e identificó de manera positiva a los marcadores CD13, CD29, CD90 CD105 y CD106, y la ausencia de los marcadores CD3, CD4, CD5, CD11b, CD14, CD15, CD34, CD45 , CD45Ra y HLA-DRA. De acuerdo a sus resultados, los autores concluyen haber identificado una población de MSC pluripotente.

Una limitante en este trabajo (Jiao et al., 2012) es que durante la etapa de desarrollo de la cual obtuvieron la población evaluada, las células mesodérmicas y ectodérmicas del primordio se encuentran diferenciado a los distintos tipos celulares que forman la extremidad, por lo que hay una gran cantidad de progenitores los cuales podrían estar generando los linajes observados en este reporte, lo cual mantiene en duda la homogeneidad y potencialidad de la población evaluada.

Considero que una estrategia más adecuada para la identificación de MSC durante el desarrollo, consiste en aislar una población celular homogénea mediante la evaluación simultánea de marcadores durante una etapa embrionaria en la que aún no comienza la diferenciación de mesénquima del primordio de la extremidad. Sin embargo, las implicaciones éticas y legales limitan la realización de estos ensayos en embriones humanos, por lo que se requiere el empleo de un modelo de estudio alterno.

Uno de los modelos más empleados para el estudio de MSC es el ratón, sin embargo, a diferencia del humano en el ratón no se ha establecido un perfil de marcadores para la identificación de MSC y los marcadores propuestos hasta el momento difieren entre los diversos trabajos reportados, ninguno de ellos ha evaluado si las MSC pudieran estar presentes en etapas embrionarias. No

obstante, este modelo supone diversas ventajas para la identificación, obtención y descripción de la ontogenia de las MSC.

En un trabajo reciente (Morikawa et al., 2009), se reportó el aislamiento mediante “cell sorting” de una población de MSC de ratón derivada de médula ósea adulta con inmunofenotipo Sca-1⁺, PDGFR α ⁺, CD45⁻, Ter119⁻. Esta población fue amplificada y después de un pase, además de mantener su inmunofenotipo inicial, mostró la expresión de otros marcadores de MSC (CD29, CD44, CD49e, CD105). Posteriormente determinaron que de manera clonal, esta población es capaz de formar CFU-F y tiene un potencial de diferenciación a osteocitos, condrocitos y adipocitos en ensayos *in vitro*.

En ese mismo trabajo, se trasplantaron células Sca-1⁺, PDGFR α ⁺, CD45⁻, Ter119⁻ derivadas de un ratón GFP las cuales fueron aisladas e inmediatamente inyectadas en un ratón hospedero. Estas células fueron identificadas en la región perivascular de la médula ósea lo cual es consistente con la localización fisiológica de las MSC derivadas de médula ósea (Méndez-Ferrer et al., 2010). Adicionalmente, en el trabajo de Morikawa et al. 2009, se encontró que las células trasplantadas pueden dar lugar dentro de la médula ósea a osteoblastos, adipocitos y células perivasculares, las cuales funcionan como nicho de células hematopoyéticas. La estrategia utilizada en este trabajo permite el aislamiento de una población homogénea y multipotente. En adición a esto, su capacidad de migración a la zona perivascular de la médula ósea, así como su diferenciación a los tipos celulares que de manera fisiológica las MSC generan, demuestran que la población evaluada tiene un inmunofenotipo y características biológicas muy semejantes a las MSC. Por lo tanto, esta estrategia parece la más adecuada entre otras aproximaciones para la identificación de MSC.

La identificación de la MSC durante la embriogénesis debe considerar el contexto celular. Por ejemplo, para todas las fuentes adultas de MSC, se evalúa la ausencia de marcadores de células hematopoyéticas maduras. Sin embargo, en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario no las hay, por ello no se espera encontrar la expresión de marcadores específicos de linaje. No obstante es necesario descartar células hematopoyéticas de menor grado

de diferenciación mediante el uso de marcadores que concuerden con la etapa de desarrollo en el que se pretende identificar a las MSC.

Células troncales hematopoyéticas

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se generan todas las células sanguíneas (Fig. 10), tanto del linaje linfoide como mieloide (Laiosa et al. 2006). El linaje linfoide está conformado por linfocitos T, linfocitos B, células NK (del inglés "Natural Killer") y algunos tipos de células dendríticas. Por su parte, el linaje mieloide está compuesto por granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y algunas categorías de células dendríticas diferentes a las del linaje linfoide. Todos estos linajes surgen de una célula en común denominada célula troncal hematopoyética (HSC, del inglés "Hematopoietic stem cell"; Fig. 10a; Till & McCulloch, 1980) y para cada linaje se han caracterizado marcadores que permiten su identificación.

Identificación de células troncales hematopoyéticas adultas

Las HSC adultas fueron descubiertas en 1961 por James Till y Ernest McCulloch mediante una serie de experimentos realizados en ratones letalmente irradiados en los que demostraron que había un tipo de células hematopoyéticas capaces de reconstituir todos los linajes de las células sanguíneas, a las que nombraron "células troncales formadoras de sangre" (Till & McCulloch, 1961) y residen en la médula ósea durante la vida adulta.

Las HSC adultas tienen un inmunofenotipo linaje negativo, es decir, que no expresan marcadores específicos de linajes hematopoyéticos maduros. Por el contrario, presentan los marcadores de células hematopoyéticas indiferenciadas como son las proteínas Sca-1 y CD117 (Kincade et al., 2002). Las HSC tienen la capacidad de auto renovarse al tiempo que generan células capaces de iniciar su diferenciación. La generación de poblaciones con diferente grado de compromiso se da de manera gradual.

Primero, se generan células amplificadoras transitorias, denominadas progenitores multipotenciales. Estas células se encuentran no diferenciadas, tienen una alta proliferación y retienen su carácter multipotente (Fig. 10b). De ellas se originan los progenitores oligopotentes, los cuales están comprometidos a la formación de tipos celulares linfoides o mieloides (Fig. 10c). De ambos progenitores se derivaran los precursores de cada uno de los tipos celulares hematopoyéticos (Fig. 10d) los cuales maduran en los órganos linfáticos periféricos (Fig. 10e; Laiosa et al., 2006).

Tanto las HSC y como los progenitores multipotentes y oligopotentes mantienen la expresión de la proteína CD117, mientras que Sca-1 se expresa únicamente en las HSC y los progenitores multipotentes. Se ha encontrado que desde las HSC hasta los progenitores oligopotentes se mantiene un fenotipo Lin⁻, sin embargo en cada categoría se expresan nuevas proteínas que dan identidad a cada progenitor (Tabla 1; Pelayo et al., 2011).

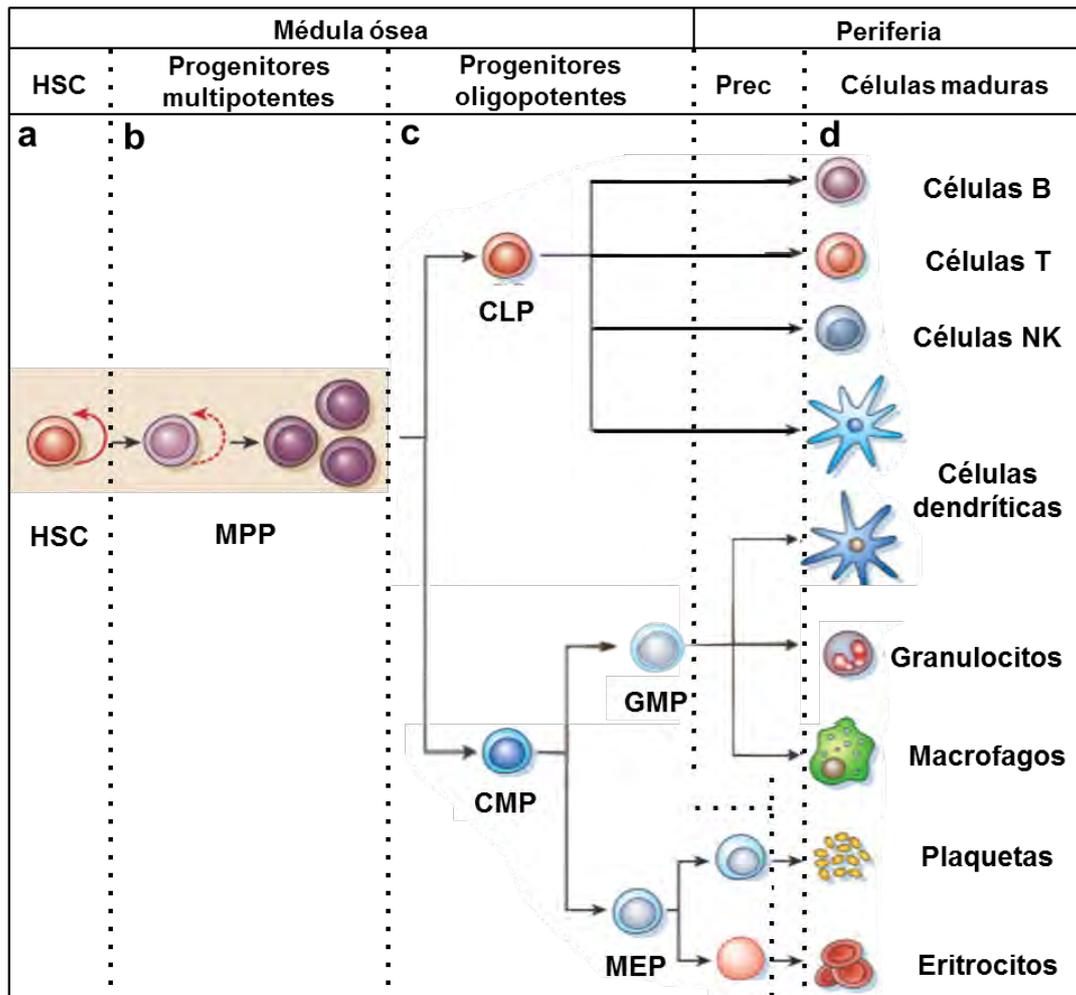


Figura 10. Hematopoyesis adulta en ratón. En las médula ósea, las células troncal hematopoyéticas (**HSC**) genera un conjunto de progenitores multipotenciales (**MPP**) de los cuales se derivan los progenitores linfoides comunes (**CLP**) y los progenitores mieloides comunes (**CMP**), de los cuales se derivan los progenitores granulocíticos y monocíticos (**GMP**) y los progenitores de megacariocitos y eritrocitos (**MEP**). Finalmente se generan precursores específicos de cada tipo celular, los cuales maduran en los órganos linfáticos periféricos. (Modificado de Reya et al. 2001).

Identificación de células troncales hematopoyéticas embrionarias

La hematopoyesis embrionaria en el ratón inicia a los 7.5 días post coito, con la formación de islas sanguíneas en el saco vitelino (YS, del inglés "Yolk Sac"). Después de la primera mitad de la gestación, la hematopoyesis se lleva a cabo en el hígado fetal, posteriormente en el bazo y finalmente en la MO.

Progenitor	Fenotipo	Potencial
HSC	Lin ⁻ ckit ^{hi} Sca1 ⁺ Flk2 ⁻ CD34 ⁻ Slamf1 ⁺	Todos los linajes
MPP	Lin ⁻ ckit ^{hi} Sca1 ⁺ Flk2 ⁻ CD34 ⁻ Slamf1 ⁺	Todos los linajes
CLP	Lin ⁻ ckit ^{lo} Sca1 ⁺ IL-7RA ⁺ CD27 ⁺	Células B, T, NK y células dendríticas
CMP	Lin ⁻ ckit ⁺ Sca1 ⁻ CD34 ⁺ FcγR ^{lo}	Eritrocitos, plaquetas, granulocitos, macrófagos y células dendríticas
MEP	Lin ⁻ ckit ⁺ Sca1 ⁻ CD34 ⁻ FcγR ⁻	Eritrocitos, plaquetas
GMP	Lin ⁻ ckit ⁺ Sca1 ⁻ CD34 ⁺ FcγR ⁺	Granulocitos, macrófagos y células dendríticas

Tabla 1. Propiedades de las células troncales y progenitores hematopoyéticos.

Se muestra el fenotipo y potencial de diferenciación de: Célula troncal hematopoyética (**HSC**, del inglés "Hematopoietic Stem Cells"). Progenitor multipotencial (**MPP**, MultiPotential Progenitor). Progenitor linfoide común (**CLP**, Common Lymphoid Progenitor). Progenitor mielóide común (**CMP**, Common Myeloid Progenitor). Progenitores de megacariocitos y eritrocitos (**MEP**, Megakaryocytes and Erythrocytes Progenitor). Progenitor de granulocitos y monocitos (**GMP**, Granulocytes and Monocytes Progenitor).

La hematopoyesis sucede en dos eventos distintos del desarrollo, el primero es una hematopoyesis restringida únicamente a la formación de eritrocitos en las islas de sangre del saco vitelino, antes de que ocurra la conexión entre la circulación del YS y el embrión. El segundo evento es la hematopoyesis definitiva, que se considera la mayor fuente de la hematopoyesis adulta y se lleva a cabo tanto en el YS como en el embrión. En éste último se desarrolla en la región aórtica, en particular en la región esplenopleura para-aórtica y el mesonefros-aortagonadal. En estas zonas se han identificado las células hematopoyéticas troncales más tempranas con capacidad de reconstituir el linaje hematopoyético de neonatos y adultos. En especies como pollo, ratón y humanos, estas células hematopoyéticas surgen como agrupaciones intra-aórtico-arteriales (IACs, del inglés "Intra-Aortic-arterial Clusters") adheridas al piso de las arterias largas (Fig. 11; Dzierzak & Speck, 2008).

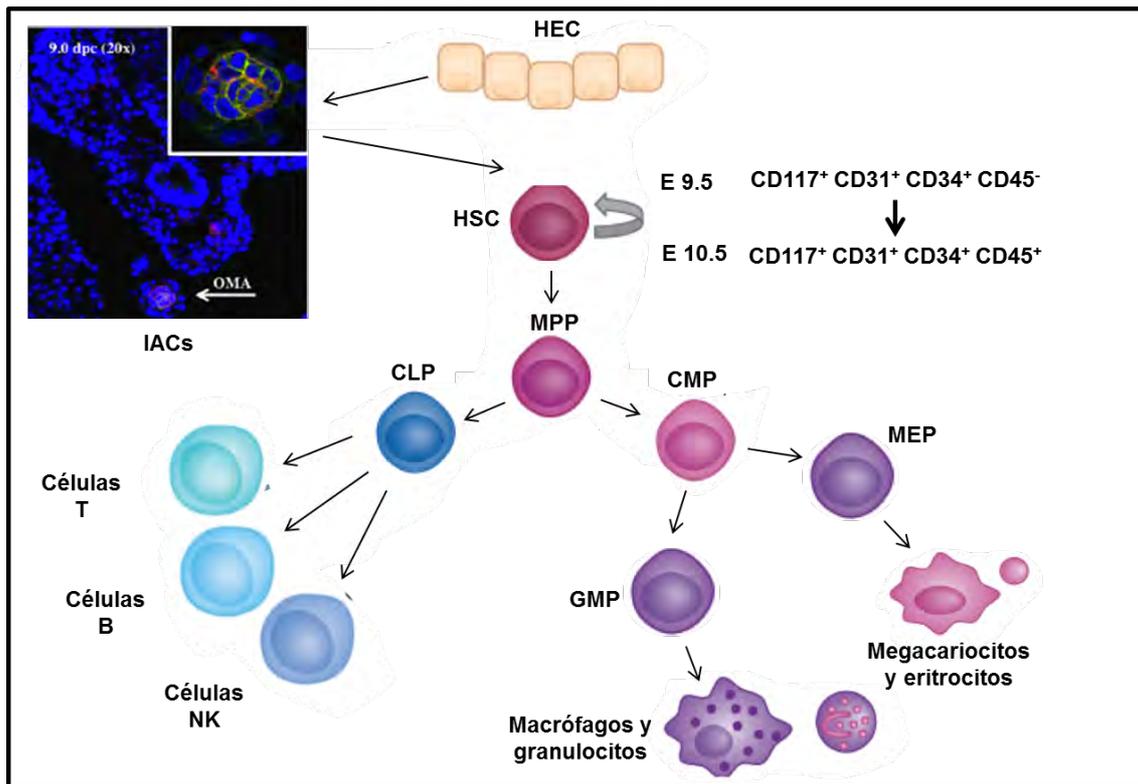


Figura 11. Desarrollo embrionario de la hematopoyesis definitiva en ratón. Las HSC surgen de las células hemogénicas endoteliales (HEC, del inglés “Hemogenic Endothelial Cell”), como agrupaciones intra aórtico-arteriales (IACs, del inglés “Intra Aortic-arterial Clusters”) adheridas al piso de las arterias largas. La transición entre el fenotipo $CD117^+ CD31^+ CD34^+ CD45^-$ en E 9.5 al fenotipo $CD117^+ CD31^+ CD34^+ CD45^+$ en E 10.5 concuerda con la aparición de las HSC más tempranas que generan la hematopoyesis adulta. (Modificado de Welinder & Murre, 2011; Mizuochi et al., 2012).

Los IACs expresan los marcadores hematopoyéticos CD117, CD41, así como los marcadores endoteliales, CD31, CD34 y VE-cadherina, por lo que se ha sugerido que los precursores de las células troncales hematopoyéticas (pre-HSC) se derivan de las células endoteliales en las regiones arterio-aórticas. Se ha descrito que la proteína CD45 no es expresada en la superficie de los IACs en el día embrionario 9.5 pero que su expresión inicia en el día 10.5 y es en esta etapa se han identificado las HSC más tempranas con capacidad de reconstituir el linaje hematopoyético de neonatos y adultos. Por esta razón, se ha sugerido que si bien CD45 no tiene aún una función identificada en el desarrollo de las HSC, su expresión puede ser utilizada como marcador de la maduración de los precursores de HSC hacia HSC maduras. Conforme el

desarrollo avanza, las HSC mantienen la expresión de CD117 al tiempo que comienzan a expresar otras proteínas como Sca-1, considerado un marcador de HSC fetales y adultas (Mizuochi et al., 2012).

Por lo tanto, la presencia de CD117 en conjunto con CD45 y Sca-1, abarca a un grupo amplio de células hematopoyéticas tales como HSC embrionarias, fetales tardías, adultas, y progenitores multipotentes adultos (Mizuochi et al., 2012), por lo que el uso de estas tres proteínas como marcadores negativos permite la exclusión de un amplio grupo de células hematopoyéticas presentes durante el desarrollo embrionario.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células mesenquimales que dan origen a la extremidad tienen características en común con las células troncales mesenquimales adultas, lo que sugiere que las células del primordio de la extremidad pueden ser MSC. Por lo tanto, ¿Las células mesenquimales del primordio tienen un inmunofenotipo troncal mesenquimal?

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es evaluar mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores CD90, CD73, CD105, Sca-1 y CD117 para realizar una comparación entre inmunofenotipos previamente reportados para la identificación de MSC con el fin de determinar si existen células durante el desarrollo de la extremidad con un perfil antigénico igual o semejante.

Objetivos particulares

1. Estandarizar el método de obtención de células de los primordios de la extremidad.
2. Determinar mediante citometría de flujo las poblaciones celulares existentes en el primordio de la extremidad de acuerdo a su tamaño y complejidad.
3. Evaluar de manera individual mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105, CD45, CD117 y Sca-1.
4. Evaluar los inmunofenotipos CD73⁺ CD105⁺ CD45⁻ Sca-1⁻ y CD105⁺ Sca-1⁺ CD45⁻.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nota: Los detalles de reactivos y soluciones se describen en el apéndice.

Disección de ratones hembra gestantes y de embriones

Para cada experimento se utilizaron doce ratones gestantes de la cepa CD-1, todas sacrificados en el día 10 post coito mediante una cámara de CO₂. Todos los experimentos se realizaron en conformidad con los reglamentos institucionales del comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomedicas. Lo animales se mantuvieron en las condiciones de vivienda estándar con un ciclo luz oscuridad 12:12 horas y se les permitió el libre acceso al alimento y agua para su mantenimiento.

En la disección, se realizó una incisión de manera anterior a la abertura uretral y se prolongó a largo de la línea media ventral hasta la altura de la barbilla. Con el mismo procedimiento se cortó la pared muscular. Se localizaron los embriones y mediante un corte prolongado entre los conductos uterinos se liberó a los embriones contenidos e inmediatamente se lavó el exceso de sangre con PBS estéril y frío, posteriormente se depositaron los embriones en medio DMEM (Gibco. USA No. Cat. 11995-065) estéril y frío. Bajo un microscopio estereoscópico y con ayuda de unas pinzas del número 5, se desprendió el corion y amnios de cada embrión y se depositaron nuevamente en medio DMEM estéril y frío.

Obtención de células del primordio de la extremidad

Los primordios de las extremidades se cortaron y se mantuvieron separados los anteriores de los posteriores, para ello se utilizaron micro-tijeras (Miller No. Alemania. Cat. R-2783). Todos los primordios cortados se depositaron en un tubo cónico de 15 mL con 1 mL de medio DMEM. Los primordios se lavaron con medio DMEM y se centrifugaron durante 1 minuto a 500 rpm en una

centrífuga clínica (Solbat. No. 2745 V115). El tejido se resuspendió en 5 mL de colagenasa (Worthington. USA No. Cat. 41H1279) 0.2% y se incubó a 37°C durante 30 minutos en agitación suave. Una vez disgregado el tejido, la muestra fue centrifugada durante 5 minutos a 1000 rpm y se decantó la colagenasa. Las células fueron resuspendidas en un 1 mL de solución de lisis ACK durante 3 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron dos veces con 5 mL de medio DMEM, centrifugando y decantando el medio. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de amortiguador para FACS.

Tinción extracelular para citometría de flujo

Se calculó el número de células realizando una dilución 1:100 en azul tripano y de acuerdo al número de células viables, se dividió la muestra en alícuotas con un millón de células en tubos cónicos de 0.5 mL.

Para todas las alícuotas:

Las células fueron incubadas en 100 µL de amortiguador de tinción con la dilución de los anticuerpos estandarizada (Ver apéndice, Tabla 6) por 30 minutos a 4°C. Al término de la incubación se realizaron dos lavados con 200 µL de amortiguador de tinción y entre cada lavado se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm. Para los controles positivos se realizó una segunda incubación de las células por 30 minutos a 4 °C con estreptavidina acoplada a cada uno de los diferentes fluorocromos utilizados en el experimento y posteriormente se realizaron dos lavados más. Finalmente las muestras se fijaron en 200 µL de PBS/PFA 2% y se analizaron de 1 a 3 días después de la fijación.

Adquisición y análisis de datos

La citometría se realizó en el citómetro de flujo FACSAria localizado en la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El análisis de los datos adquiridos se realizó en el software FlowJo

versión 8.8.6 y en cada condición se adquirieron entre 10,000 y 20,000 eventos de una población delimitada.

Estadística

Debido a que se compararon los promedios entre dos grupos muestrales independientes con una mismo número de n y la variable evaluada es una variable continua (porcentajes), se realizó una prueba de t de dos colas con $p < 0.05$ Entre las muestras de CD90, CD73, CD105, CD45, y CD117 con respecto a sus isotipos control, se identificaron varianzas iguales, no así en la muestra de Sca-1 y su isotipo control. Las gráfica se realizaron en el paquete estadístico Prism 6 Trial.

RESULTADOS

Obtención y caracterización de las poblaciones existentes en los primordios de las extremidades de acuerdo a su tamaño y complejidad

Se evaluó la eficiencia del procedimiento (descrito en Metodologías) utilizado para disgregar el tejido y generar una suspensión de células individuales que no presentara afectación en la viabilidad de las células hasta el momento de fijarlas. Para este experimento se emplearon los primordios posteriores de 80 embriones de etapa E10.5 (del inglés "Embryonic day"; Kaufmann, 1992)

En la figura 12 se muestra una gráfica tipo "dot plot" de los datos adquiridos. En este tipo de gráficas se representa con un punto cada evento (célula) analizado. En el eje de las X, se muestra el tamaño celular (FSC) y en el eje de las Y, la complejidad celular (SSC). La gráfica muestra que 5.60% de los eventos adquiridos tienen un tamaño muy pequeño y poca complejidad, es frecuente considerar esta población tan cercana al origen como células muertas o fragmentos de células.

Por el contrario, en promedio 76.47% de los eventos contados están concentrados en una población grande y 6.39% en una segunda de menor tamaño. Esta pequeña población se localiza al costado izquierdo de la población más grande. El resto de los eventos se encuentran dispersos alrededor de las dos poblaciones o en valores muy altos en ambos ejes, lo cual sugiere agregados celulares.

De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que la metodología empleada no afecta de manera importante el número de células vivas hasta el momento de ser fijadas ya que más del 80% de las células evaluadas se localizaron en dos poblaciones muy bien definidas y menos del 6% de la muestra evaluada reflejaba características de células muertas.

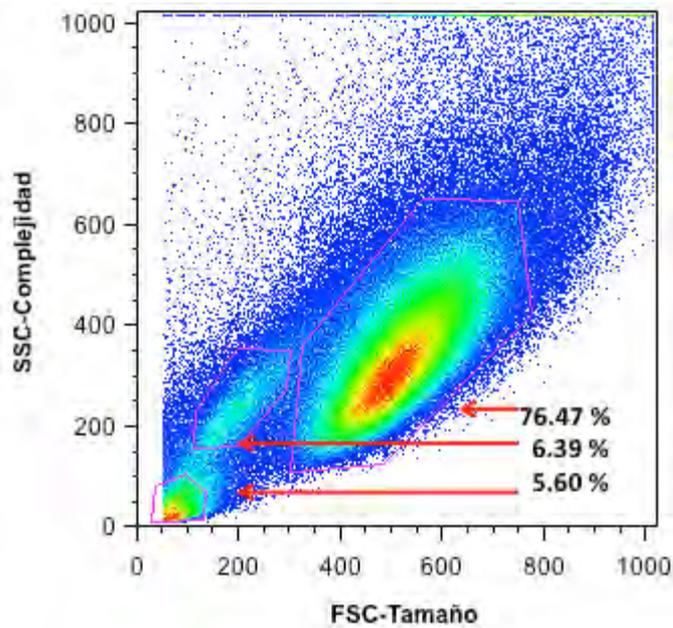


Figura 12. Distribución celular de primordios posteriores de la extremidad. Se muestra en una gráfica dot plot las poblaciones identificadas de acuerdo a tamaño y complejidad. En orden descendente, los porcentajes corresponden a una población que se encuentra en mayor abundancia, una segunda población de menor tamaño y complejidad y fragmentos celulares.

Identificación de células positivas a los marcadores CD73, CD105, CD45 y Sca-1

El siguiente objetivo fue identificar mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105, CD45, CD117 y Sca-1. Se realizaron cuatro experimentos utilizando embriones de ratones hembras con 10 días post coito de gestación. En dos de los experimentos los embriones utilizados se encontraban en etapa E10.5 y los otros dos en E11. En cada experimento se colectaron los primordios de 80 individuos y se evaluaron independientemente los primordios anteriores de los posteriores.

La suspensión de células resultante de la disgregación de los primordios se dividió en alícuotas de un millón de células a las que se les realizó las siguientes condiciones: 1) células sin teñir, no contiene anticuerpos, 2) control de isotipos, contiene la mezcla de todos los isotipos control, 3) α -CD73, 4) α -CD90 4) α -CD105, 5) α -CD45, 6) α -Sca-1 y 7) α -CD117. Para cada anticuerpo se verificó la detección del antígeno al cual está dirigido. CD90 se evaluó en

timocitos, CD73, CD45 y Sca-1 en células de bazo y CD105 y CD117 en células de MO. Los anticuerpos y estreptavidinas se enlistan en la Tabla 6.

El análisis de los marcadores en los primordios, se realizó considerando como una sola población a las dos poblaciones previamente identificadas con el fin de no excluir datos. Se delimitó la población tomando como base la muestra sin teñir, y este parámetro se utilizó para el resto de las muestras.

En la figura 13 se muestra un esquema en el que se representa cómo se determinaron los cuadrantes y a continuación se explica el procedimiento. Utilizando el control de isotipos se visualizó la población en una gráfica tipo "dot plot". En el eje de las "X" se graficó la intensidad de fluorescencia para cada uno de los fluorocromos y en el eje de las "Y" se mantuvo el parámetro SSC con el fin de mostrar únicamente la población seleccionada. Estas gráficas se usaron como referencia para establecer cuatro cuadrantes. En el cuadrante inferior izquierdo se mantuvo como negativo al menos 99.56% de la población y en el cuadrante inferior derecho se dejó el resto de la población, es decir, no más del 0.44%, que representa el pegado inespecífico de los isotipos. Los dos cuadrantes superiores siempre se mantuvieron sin porcentaje alguno de la población. En todas las gráficas los porcentajes se muestran en la esquina exterior de cada cuadrante.

Una vez establecidos los cuadrantes para cada fluorocromo en la muestra que contiene los isotipos control, estos parámetros se utilizaron idénticamente en las muestras correspondientes. Por ejemplo: los parámetros del isotipo control acoplado a FITC, se utilizaron para la muestra teñida con α -CD90FITC, los de PE para α -CD73PE y así sucesivamente. Para determinar en qué porcentaje de células es expresado cada marcador, se restó el porcentaje del pegado inespecífico (cuadrante inferior derecho de la muestra Isotipo control) al porcentaje positivo de la muestra con el α -CD correspondiente (cuadrante inferior derecho). El aumento en el porcentaje de células positivas en la muestra con el con el α -CD, significa que esas células expresan el antígeno evaluado el cual es reconocido por el anticuerpo correspondiente, que al estar acoplado a un fluorocromo puede ser detectado en el citómetro de flujo.

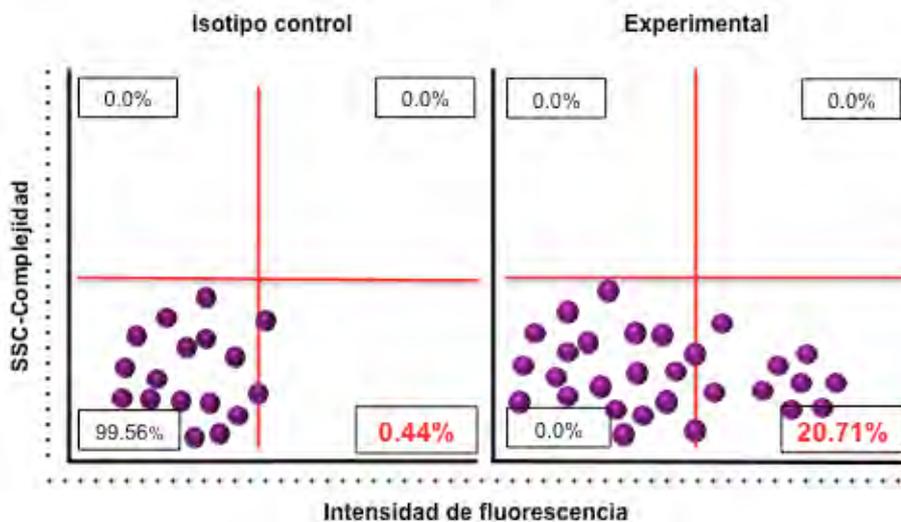


Figura 13. Representación gráfica del establecimiento de cuadrantes. Con la muestra sin teñir se establecieron cuatro cuadrantes los cuales fueron utilizados de manera idéntica en la muestra con el isotipo control y la muestra con el anticuerpo. El porcentaje de expresión de cada marcador corresponde a la diferencia entre la señal positiva de la muestra experimental y la muestra del isotipo control, por ejemplo $20.71\% - 0.44\% = 20.26\%$.

De la figura 14 a la 19, se muestra un experimento representativo de los cuatro experimentos (etapa E11).

CD90 fue evaluado en timocitos, en los cuales se identificó que el 84.5% de la población es positiva a este marcador (Fig.14). En los primordios, la variabilidad y el bajo porcentaje de células positivas a este marcador, (Fig.14; Tabla 2 y Tabla3), sugiere que las ocasiones en las que se identificaron valores positivos corresponden al fondo basal de la muestra.

Por otra parte, CD117 se evaluó en células de MO, de las cuales 15.4% son positiva a este marcador (Fig. 19), mientras que en los primordios, en todos los experimentos se identificó la misma señal positiva tanto en las muestras del isotipo control como las muestras experimentales (Fig. 19; Tabla 2 y Tabla 3), por lo que no fue posible determinar si hay células que expresan CD117.

Tanto para CD90 (Fig. 20a y 21a) . como CD117 (Fig. 20f y 21f), no se encontró una diferencia significativa ($p=0.05$) entre los promedios de las muestras experimentales con respecto a los promedios del isotipo control.

En los cuatro experimentos realizados se identificó tanto en primordios anteriores como posteriores, la presencia de células positivas a CD73, CD105, CD45 y Sca-1 (Tabla 2.)

CD73 se identificó en un 17.70% en células de bazo (Fig. 15). En los primordios anteriores, el promedio de los porcentajes de los cuatro experimento fue de 4.00% (Tabla. 2) mientras que en los primordios posteriores fue de 4.30% (Tabla. 3).

Por su parte, CD105 se identificó en un 11.2% en médula ósea (Fig. 16), mientras que en los primordios anteriores, el promedio de los porcentajes de los cuatro experimento fue de 1.13% (Tabla. 2) mientras que en los primordios posteriores fue de 2.82% (Tabla. 3).

En células de bazo se identificó que 94.5% de la población es positiva a CD45 (Fig. 17) y en los primordios anteriores se identifico en promedio un 0.55% (Tabla. 2) y en los posteriores, un promedio de 0.66% (Tabla. 3) de células positivas a este marcador.

Finalmente, Sca-1 también se evaluó en células de bazo, de los cuales un 87.0% (Fig. 18) de la población mostró ser positiva a este marcados , mientras que en los primordios anteriores se identificó un promedio de 1.73% (Tabla. 2) y en los posteriores un promedio de 1.86% (Tabla. 3) de células positivas.

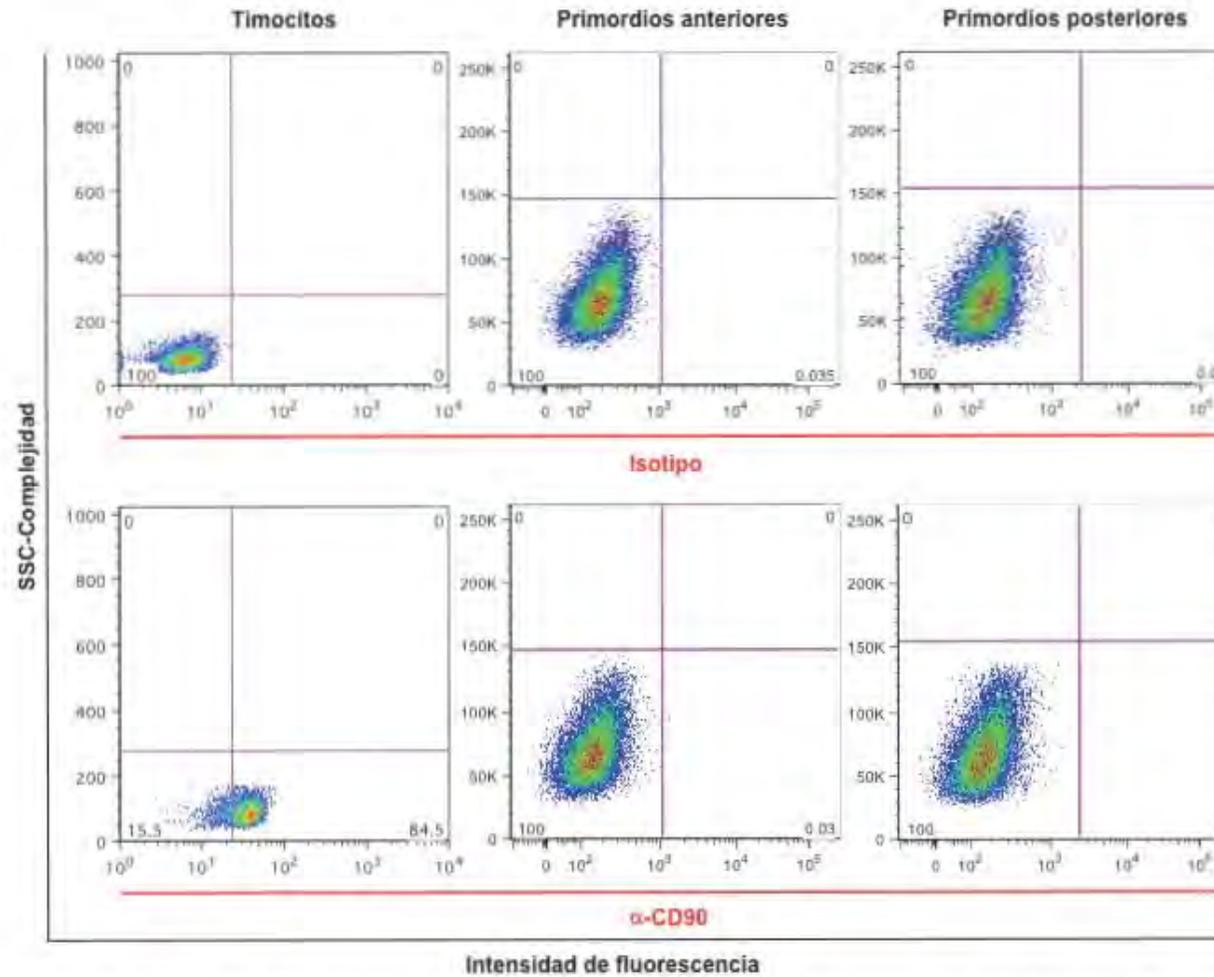


Figura 14. **Evaluación de CD90.** Experimento representativo (E11). La primera fila corresponde a los controles de isotipo y la segunda fila corresponde a las muestras con los anticuerpos experimentales. De izquierda a derecha, en la primer columna se muestra la identificación de CD90 en timocitos. En las segunda y tercer columna se muestra la evaluación de ese marcador en primordios anteriores y posteriores correspondientemente.

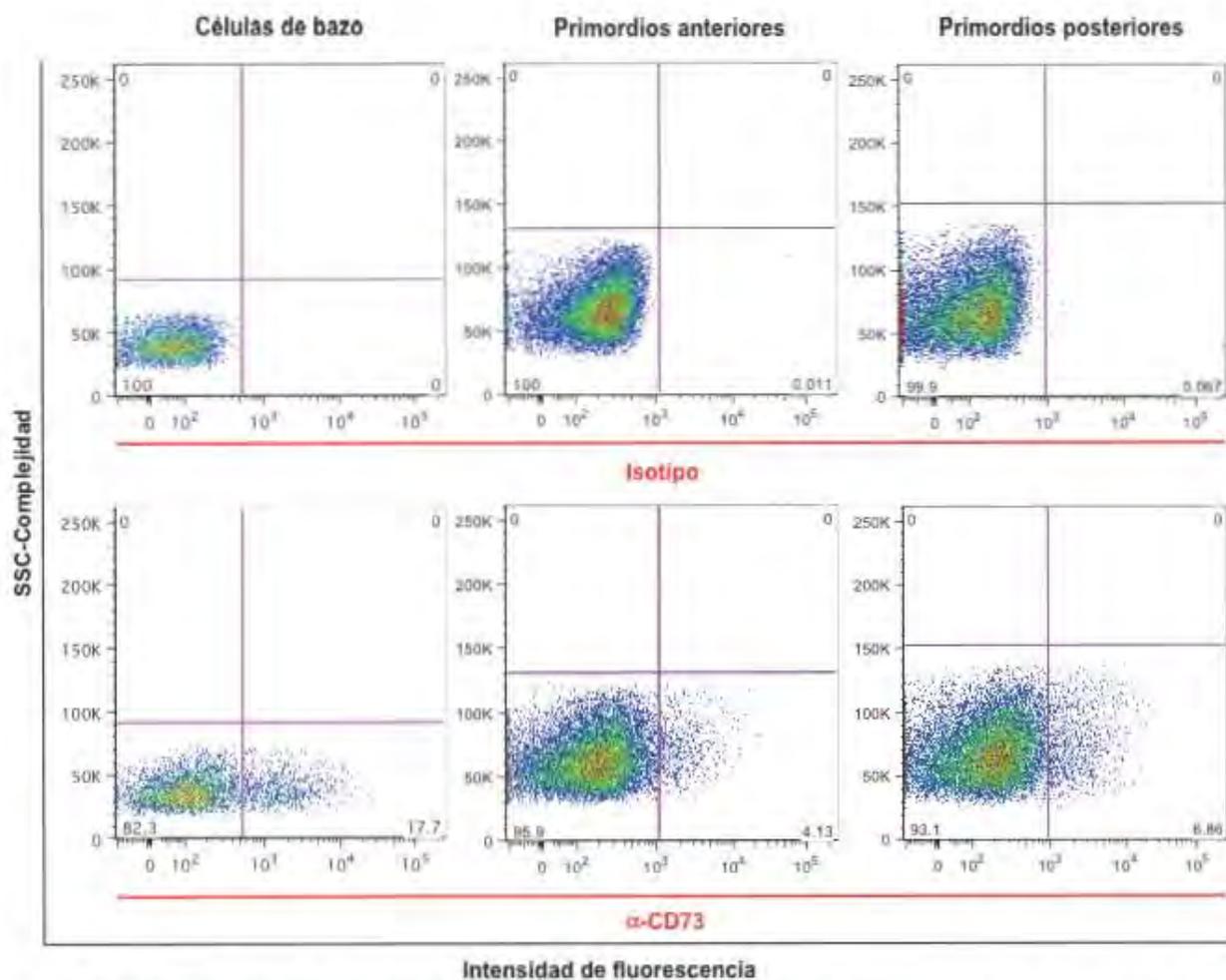


Figura 15. Evaluación de CD73. Experimento representativo (E11). La primera fila corresponde a los controles de isotipo y la segunda fila corresponde a las muestras con los anticuerpos experimentales. De izquierda a derecha, en la primer columna se muestra la identificación de CD73 en células de bazo. En las segunda y tercer columna se muestra la evaluación de este marcador en primordios anteriores y posteriores correspondientemente.

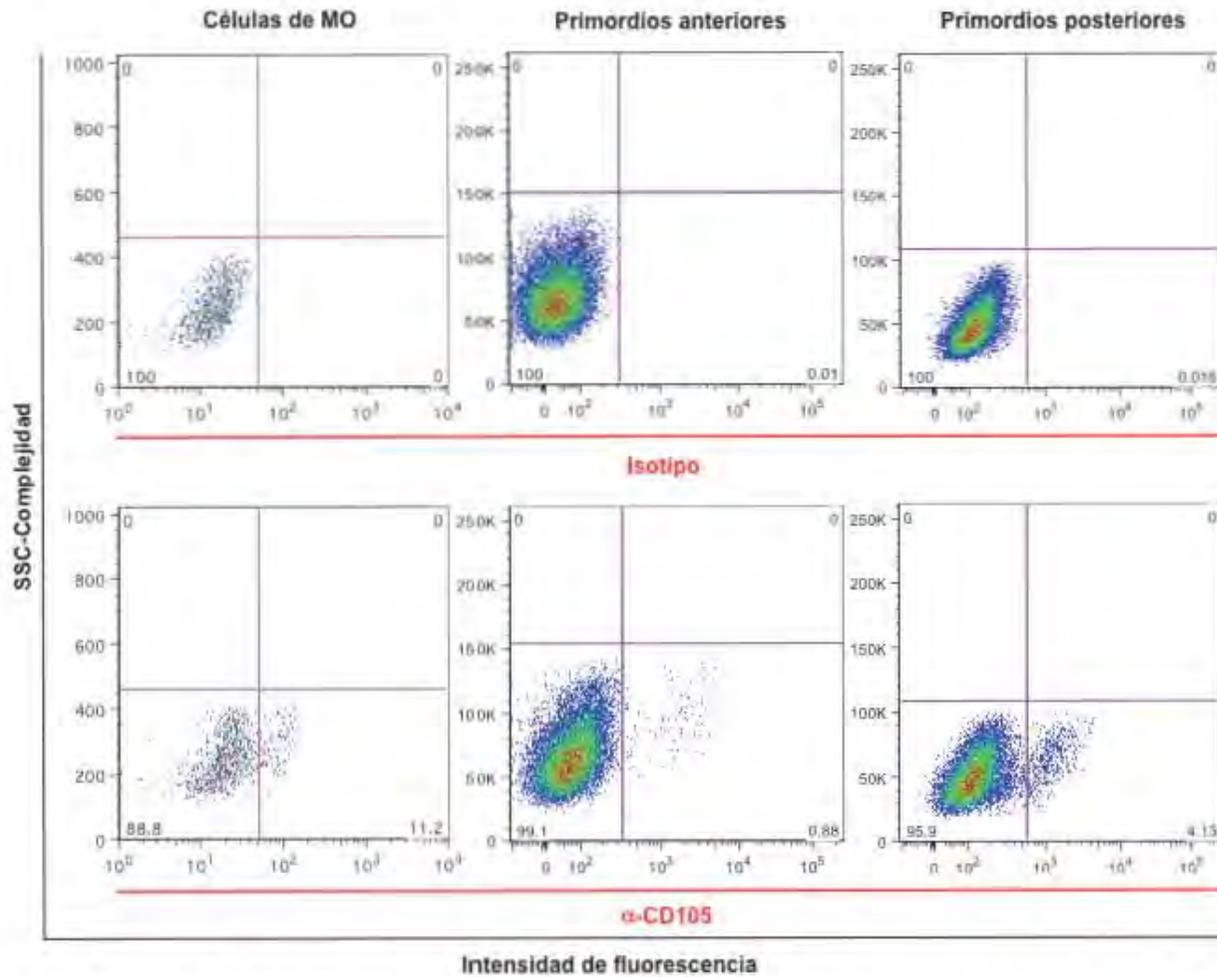


Figura 16. Evaluación de CD105. Experimento representativo (E11). La primera fila corresponde a los controles de isotipo y la segunda fila corresponde a las muestras con los anticuerpos experimentales. De izquierda a derecha, en la primer columna se muestra la identificación de CD105 en células de MO. En las segunda y tercer columna se muestra la evaluación de este marcador en primordios anteriores y posteriores correspondientemente.

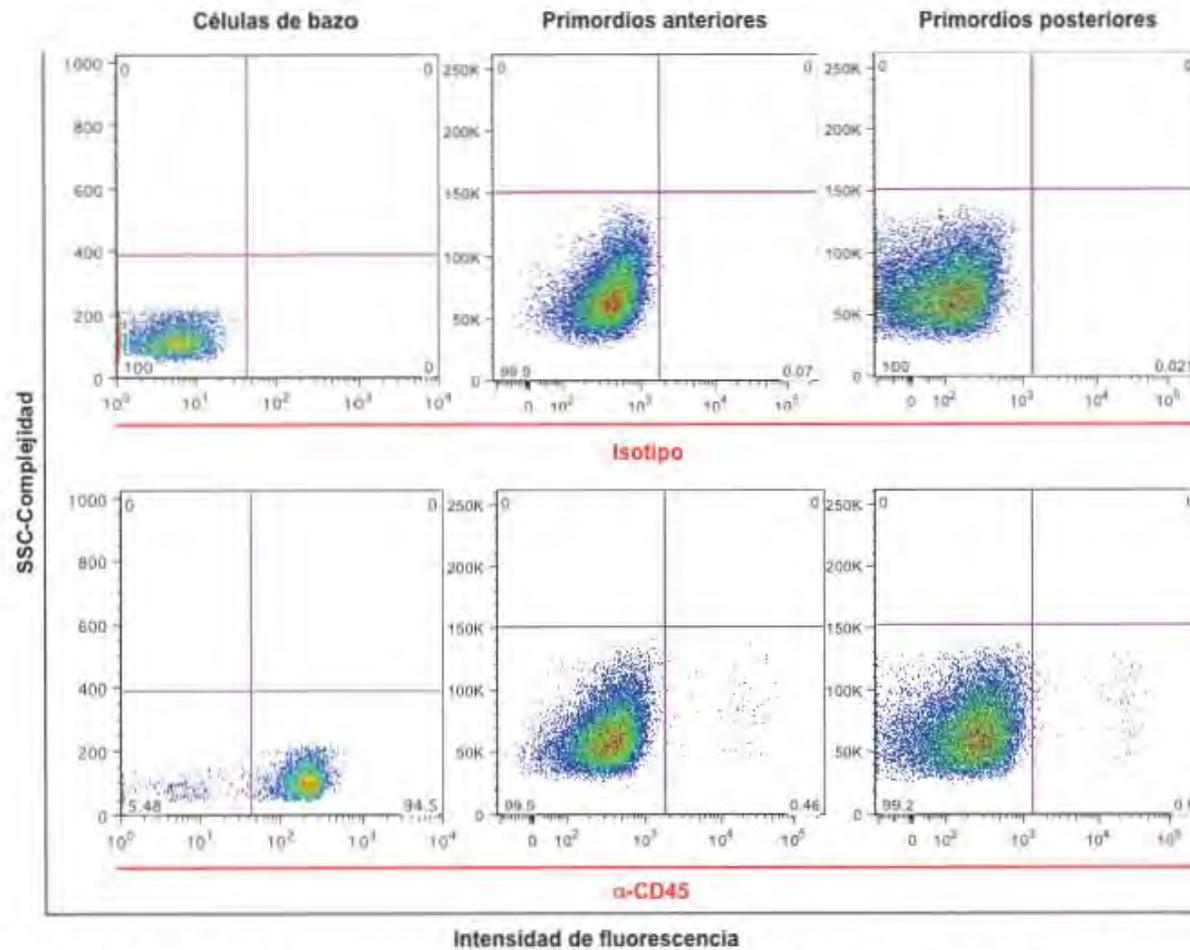


Figura 17. Evaluación de CD45. Experimento representativo (E11). La primera fila corresponde a los controles de isotipo y la segunda fila corresponde a las muestras con los anticuerpos experimentales. De izquierda a derecha, en la primer columna se muestra la identificación de CD45 en células de bazo. En las segunda y tercer columna se muestra la evaluación de este marcador en primordios anteriores y posteriores correspondientemente.

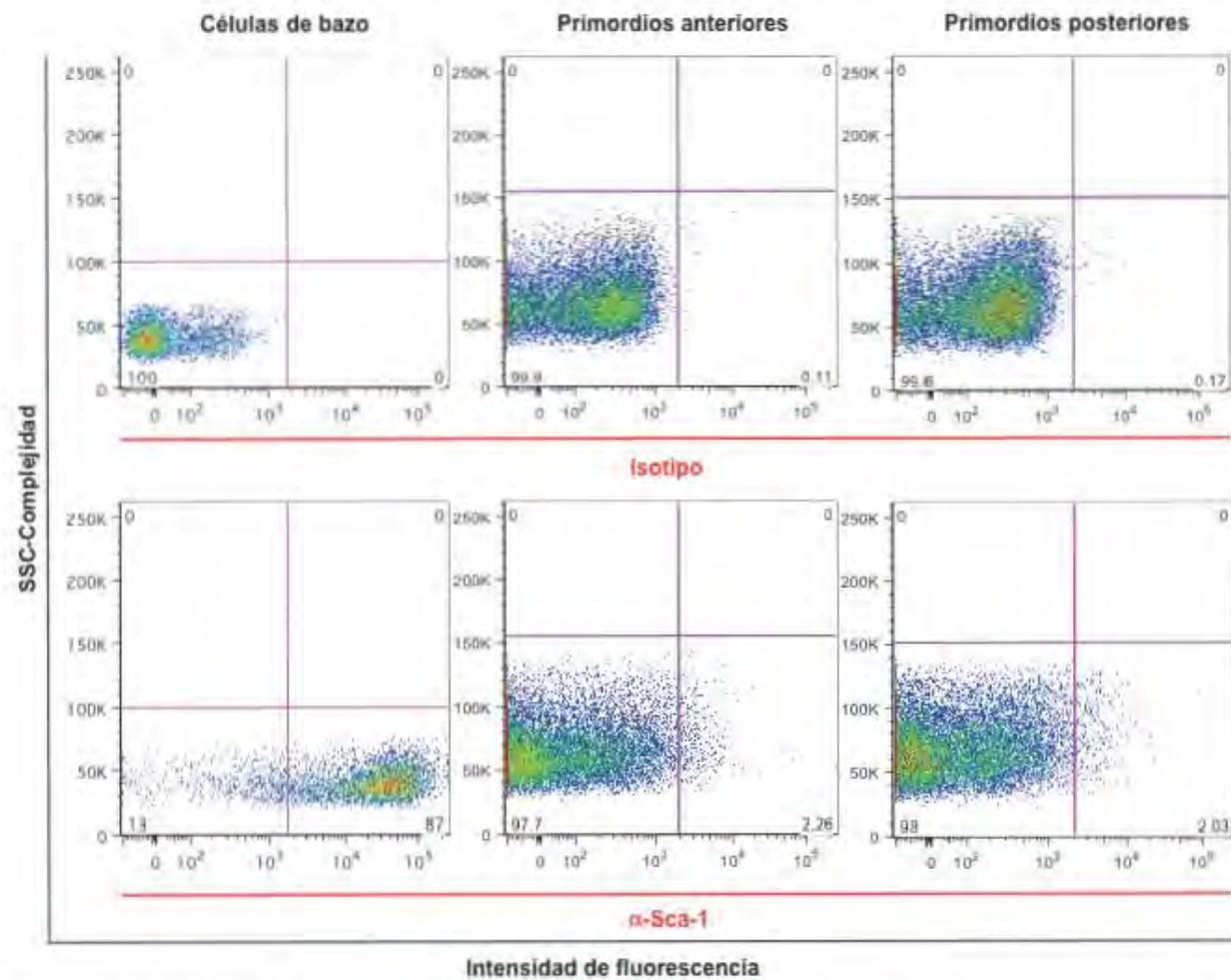


Figura 18. Evaluación de Sca-1. Experimento representativo (E11). La primera fila corresponde a los controles de isotipo y la segunda fila corresponde a las muestras con los anticuerpos experimentales. De izquierda a derecha, en la primer columna se muestra la identificación de Sca-1 en células de bazo. En las segunda y tercer columna se muestra la evaluación de este marcador en primordios anteriores y posteriores correspondientemente.

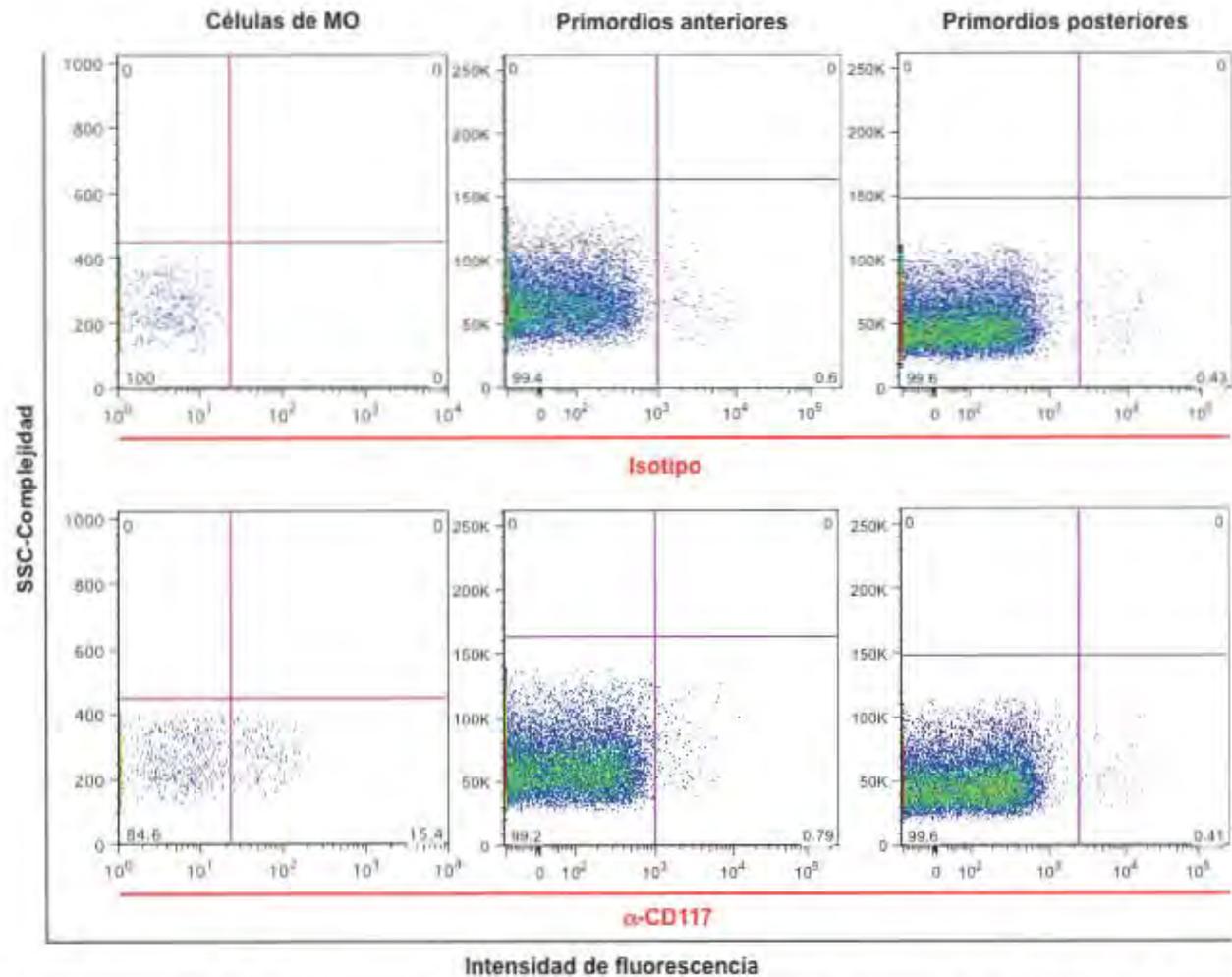


Figura 19. Evaluación de CD117. Experimento representativo (E11). La primera fila corresponde a los controles de isotipo y la segunda fila corresponde a las muestras con los anticuerpos experimentales. De izquierda a derecha, en la primer columna se muestra la identificación de CD117 en células de MO. En la segunda y tercer columna se muestra la evaluación de este marcador en primordios anteriores y posteriores correspondientemente.

Tanto en los primordios anteriores como en los posteriores, se encontró que hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los promedios de las muestras experimentales con respecto a los promedios del isotipo control al evaluar los marcadores CD73, CD105, CD45 y Sca-1. En la Tabla 2 y 3 se muestran los valores de los isotipo control y las muestras experimentales de los cuatro ensayos realizados.

Marcador	CD90		CD73		CD105		CD45		Sca-1		CD117	
Etapa	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp
10.5	0.210	0.079	0.120	3.330	0.120	1.190	0.120	0.700	0.200	1.650	0.420	0.640
	0.005	0.000	0.420	4.470	0.000	1.040	0.130	0.470	0.300	2.500	0.430	0.410
11	0.000	0.240	0.078	4.090	0.370	1.420	0.000	0.580	0.120	0.510	0.460	0.057
	0.035	0.030	0.011	4.130	0.010	0.880	0.070	0.460	0.110	2.260	0.600	0.790
m	0.063	0.087	0.157	4.005*	0.125	1.133*	0.080	0.553*	0.183	1.730*	0.478	0.474

Tabla 2. Porcentaje de células positivas a los marcadores CD90, CD73, CD105, CD45, Sca-1 y C117 en primordios anteriores de etapa E10.5 y E11. Se muestran los porcentajes de señal positiva en la muestra con el isotipo control (Iso) y la muestra experimental (Exp). En el renglón m se muestra la media de los cuatro experimentos realizados. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al isotipo control.

Marcador	CD90		CD73		CD105		CD45		Sca-1		CD117	
Etapa	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp	Iso	Exp
10.5	0.210	0.079	0.120	3.330	0.120	1.190	0.120	0.700	0.200	1.650	0.420	0.640
	0.005	0.000	0.420	4.470	0.000	1.040	0.130	0.470	0.300	2.500	0.430	0.410
11	0.000	0.240	0.078	4.090	0.370	1.420	0.000	0.580	0.120	0.510	0.460	0.057
	0.035	0.030	0.011	4.130	0.010	0.880	0.070	0.460	0.110	2.260	0.600	0.790
m	0.063	0.087	0.157	4.005*	0.125	1.133*	0.080	0.553*	0.183	1.730*	0.478	0.474

Tabla 3. Porcentaje de células positivas a los marcadores CD90, CD73, CD105, CD45, Sca-1 y C117 en primordios posteriores de etapa E10.5 y E11. Se muestran los porcentajes de señal positiva en la muestra con el isotipo control (Iso) y la muestra experimental (Exp). En el renglón m se muestra la media de los cuatro experimentos realizados. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al isotipo control.

Identificación de los inmunofenotipos CD73⁺ CD105⁺ CD45⁻ Sca-1⁻ y CD105⁺ Sca-1⁺ CD45⁻ en la extremidad embrionaria de ratón

Después de identificar de manera individual cada marcador, proseguimos a determinar si los marcadores CD73 y CD105 son expresados de manera conjunta y si estas células carecen de la expresión de los marcadores hematopoyéticos CD45 y Sca-1.

Se emplearon ochenta embriones por experimento, de los cuales se disecaron y separaron los primordios anteriores de los posteriores. Al igual que en los experimentos anteriores se obtuvo una suspensión celular y se realizaron las siguientes condiciones de tinción: 1) Sin teñir, 2) control de isotipos, 3) α -CD73PE + α -CD105APC + α -CD45PerCpCy5.5 + α -Sca-1PECy7 4) α -C49e biotinilado + estreptavidina PE 5) α -C49e biotinilado + estreptavidina APC 6) α -C49e biotinilado + estreptavidina PerCpCy5.5 y 7) α -C49e biotinilado + estreptavidina PECy7. Las condiciones 4 a 7 son controles que se realizaron con la finalidad de compensar la superposición en los espectros de emisión de cada fluorocromo (ver APÉNDICE, Citometría de flujo, Compensación para el uso de múltiples fluorocromos). Los anticuerpos y estreptavidinas se enlistan en la Tabla 6 y 7.

CD49e, también conocido como receptor de fibronectina, se expresa ampliamente en células mesenquimales del primordio de la extremidad, en un 94.4% (Fig. 22), por lo que elegimos este marcador como señal positiva para realizar la compensación.

Los resultados muestran que, un bajo porcentaje de células expresan simultáneamente los marcadores CD73 y C105 (Fig. 23). En la extremidades anteriores, se encontró en un 0.10% de células CD73⁺ y C105⁺ mientras que en las posteriores el porcentaje fue de 0.30%. En las extremidades anteriores, las células positivas a CD73 y C105 fueron mayoritariamente negativas a CD45 y Sca-1 (Fig. 23), con un porcentaje de 89.5% (Fig. 23), y en las posteriores el porcentaje fue de 77.2% (Fig. 23). Con respecto al %100 de la población total, en los primordios anteriores un 0.09% (Tabla 4) y en los posteriores un 0.23% (Tabla 4) de células fueron identificadas como CD73⁺, CD105⁺, CD45⁻ y Sca-1⁻.

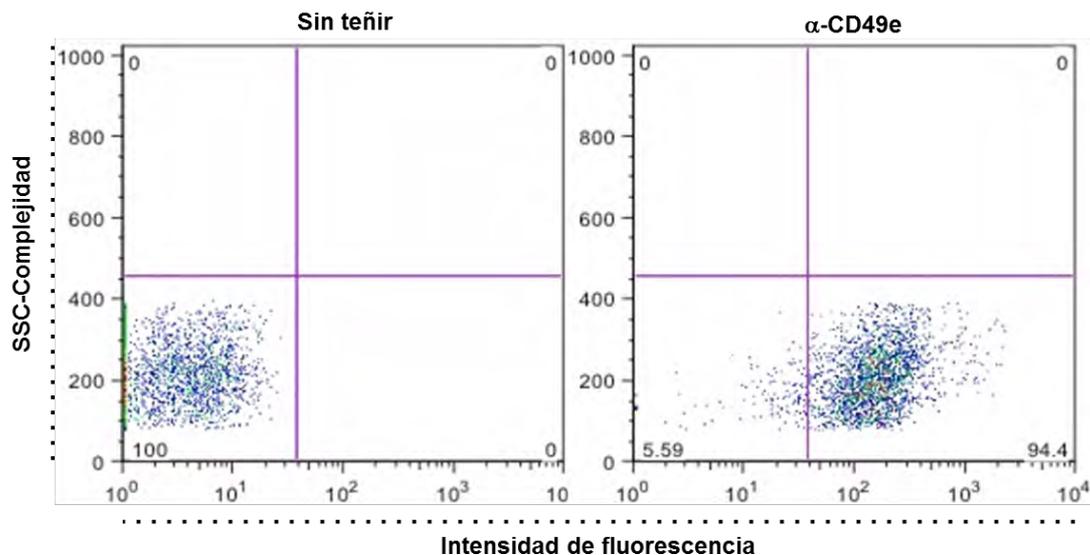


Figura 22. Expresión de CD49e (receptor de fibronectina) en primordios posteriores de etapa E11. En el panel izquierdo se presenta la muestra control sin anticuerpo primario. En el panel derecho se observa la muestra con el anticuerpo α -CD49e y estreptavidina acoplada a PE. Para compensar también se empleó estreptavidina acoplada a APC, PerCPCy5.5 y PECy7.

Posteriormente evaluamos el inmunofenotipo $CD105^+ Sca-1^+ CD45^-$. Se realizaron tres experimentos, uno de ellos en estadio E10.5 y dos en estadios E11. En la figura 24, se muestran un experimento representativo (E11). En los tres experimentos se identificó una población con inmunofenotipo $CD105^+ Sca-1^+ CD45^-$, en un promedio de 0.06% (Fig. 24) en los primordios anteriores (Tabla 4) y 0.09% (Fig. 24) en los posteriores (Tabla 4).

Inmunofenotipo	A		P	
	Iso	Exp	Iso	Exp
$CD73^+ CD105^+ CD45^- Sca-1^-$	0.00%	0.09%	0.00%	0.23%
$CD105^+ Sca-1^+ CD45^-$	0.00%	0.06%	0.00%	0.09%

Tabla 4. Porcentaje de células con un inmunofenotipo relacionados con la identificación de células troncales mesenquimales. Los porcentajes que se muestran están calculados con respecto a la población inicial total. **A)** Anterior. **P)** Posterior. **Iso)** Isotipo control. **Exp)** Experimental. En el inmunofenotipo $CD73^+, CD105^+, CD45^-$ y $Sca-1^-$ n=1 y en el inmunofenotipo $CD105^+ Sca-1^+ CD45^-$ n=3.

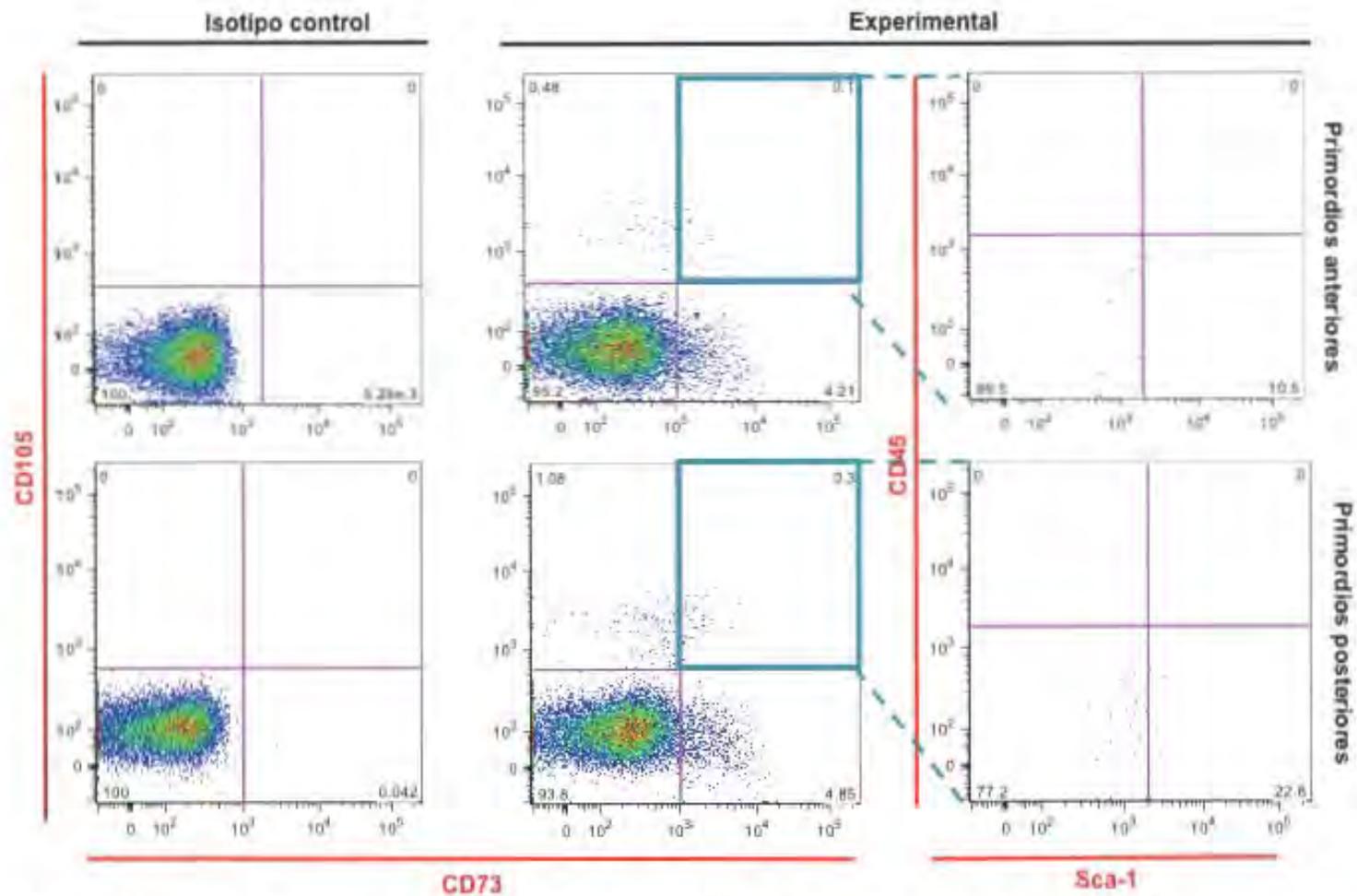


Figura 23. Identificación del inmunofenotipo $CD73^+ CD105^+ CD45^- Sca-1^-$ en primordios anteriores y posteriores de etapa E11. De izquierda a derecha, en la primera columna se muestran los controles de isotipo de los anticuerpos a-CD73 y a-CD105. En la columna central se observan las muestras con los anticuerpos experimentales. De la población $CD73^+ CD105^+$ (recuadro azul) se analizó la expresión de Sca-1 y CD45, la cual se muestra en la tercer columna.

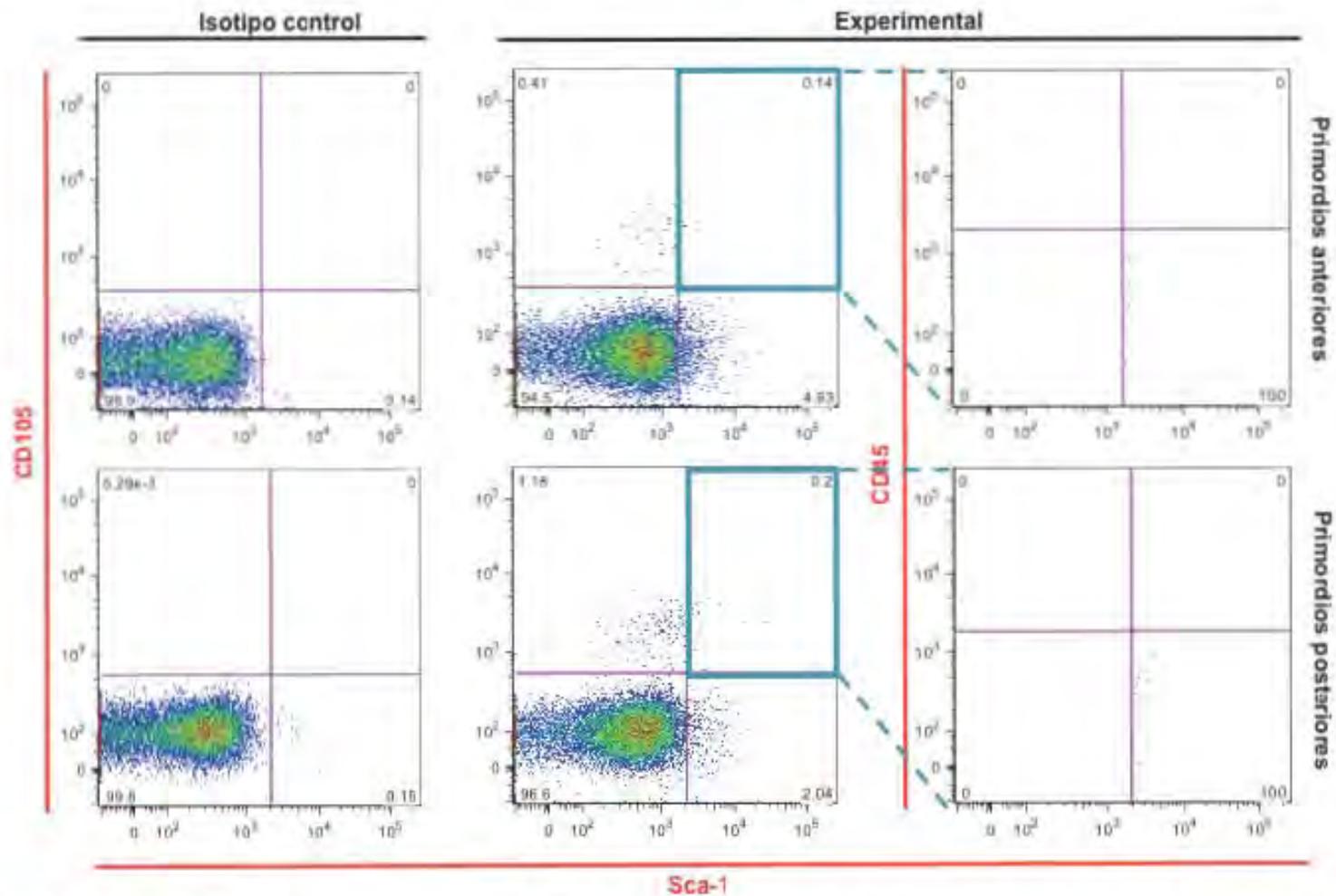


Figura 24. Identificación del inmunofenotipo CD105⁺ Sca-1⁺ CD45 en primordios anteriores y posteriores de etapa E11. De izquierda a derecha, en la primera columna se muestran los controles de isotipo de los anticuerpos a-CD105 y a-Sca-1, en la columna central se observan las muestras con los anticuerpos experimentales. De la población CD105⁺ Sca-1⁺ (recuadro azul) se analizó la expresión de CD45, la cual se visualiza en la tercer columna (junto con Sca-1).

DISCUSIÓN

Se realizaron cuatro experimentos para identificar si las proteínas CD90, CD73, CD105, CD45, Sca-1 y CD117 son expresadas en el primordio de la extremidad. Aún cuando se emplearon ratones hembras gestantes, siempre de 10 días post coito de gestación, identificamos que en dos de los experimentos los embriones utilizados se encontraban en etapa E10.5 y en dos ocasiones en E11.

Para poder determinar si los porcentajes de células positivas a cada marcador eran significativamente diferentes con respecto a su controles correspondientes, consideramos como un solo grupo a las dos etapas. Sin embargo, en los estudios subsecuentes debe considerarse que en los primordios de etapa E10.5 y E11 hay diferencias sustanciales en el estado de diferenciación de las células del mesénquima del primordio (Ten-Berge et al., 2008).

De acuerdo a nuestros resultados identificamos la presencia de células positivas de manera individual a CD73, CD105, CD45 y Sca-1 y no así a CD90 y CD117.

Con base en los marcadores identificados en nuestros resultados y los inmunofenotipos que han sido propuestos para la identificación de MSC, se evaluaron e identificaron dos perfiles antigénicos.

En humanos, la expresión conjunta de **CD90⁺ CD73⁺ CD105⁺**, en ausencia de marcadores hematopoyéticos, se ha descrito (Dominici et al., 2006) como el inmunofenotipo más aceptado para la identificación de MSC en MO adulta. En nuestros resultados no identificamos la expresión de CD90, no obstante evaluamos la expresión conjunta de **CD73⁺ CD105⁺** en ausencia de los marcadores hematopoyéticos **CD45⁻ y Sca-1⁻**. Encontramos en los primordios anteriores y posteriores de embriones de estadio E11 (no se evaluó en 10.5) un 0.09% y un 0.23% correspondientemente de células con inmunofenotipo **CD73⁺ CD105⁺ CD45⁻ y Sca-1⁻** (Tabla 4). Dado que en médula ósea adulta, las MSC se encuentran en un 0.02%, esperábamos porcentajes bajos.

De acuerdo a la literatura, la función y expresión de CD73 y CD105 está relacionada con células del linaje hematopoyético. Por una parte CD73 se expresa en linfocitos T y B (Resta & Thompson, 1997), mientras que CD105 se expresa en poblaciones pre-eritroblásticas y células leucémicas del linaje mieloide y linfoide (Barbara, 1999). Por otra parte, la expresión de CD45 se ha identificado en una gran variedad de leucocitos (Rhee & Veillette, 2012) mientras que su expresión en conjunto con Sca-1, abarca a un grupo amplio de células hematopoyéticas indiferenciadas como las HSC (embrionarias, fetales tardías y adultas) y progenitores multipotentes adultos (Mizuochi et al., 2012; Kincade et al., 2002).

Por lo tanto, la población identificada como **CD73⁺ CD105⁺ CD45⁻ Sca-1⁻** es positiva a dos marcadores de células troncales mesenquimales y no pertenece al linaje hematopoyético. No obstante, debe verificarse su negatividad a CD117 ya que este marcador descartaría otro grupo de células hematopoyéticas que los marcadores CD45 y Sca-1 no. Por otra parte, sería interesante evaluar a lo largo del desarrollo de la extremidad si esta población eventualmente expresa a CD90.

La segunda población identificada posee un inmunofenotipo **CD105⁺ Sca-1⁺ CD45⁻** (Fig. 15). En 2012, Morikawa et al., publicaron un protocolo para la identificación de MSC en MO de ratón, en el cual identifican que una población con el inmunofenotipo **Sca-1⁺ PDGFR α ⁺ CD29⁺ CD44⁺ CD49e⁺ CD105⁺ CD45⁻ Ter119⁻**, en ensayos clonogénicos, tiene un potencial de diferenciación a osteocitos, condrocitos y adipocitos. Esta población es también capaz de migrar a la MO y establecerse en los nichos de MSC que han sido previamente descritos en médula ósea (Méndez-Ferrer et al., 2010).

En nuestros ensayos de citometría encontramos que CD49e, también conocido como receptor de fibronectina, se expresa de manera homogénea en el mesénquima de la extremidad, aproximadamente en un 95% de la población total (Fig. 13), consideramos que el 5% de células negativas a este marcador creemos corresponde a las células del ectodermo del primordio.

Por otra parte, CD44 es también conocido como el receptor del ácido hialurónico, el cual interactúa con ligandos como osteopontina, fibras de colágena y metaloproteinasas de matriz extracelular. Se ha descrito que CD44 se expresa a lo largo del desarrollo de la extremidad embrionaria de pollo (Rousche & Knudson, 2002).

Estas evidencia sugieren que la población **CD105⁺**, **Sca-1⁺** y **CD45⁻** podría ser también positiva a los marcadores **CD44** y **CD49e**, lo cual indica una coincidencia con el inmunofenotipo **Sca-1⁺**, **PDGFR α ⁺**, **CD29⁺**, **CD44⁺**, **CD49e⁺**, **CD105⁺**, **CD45⁻**, **Ter119⁻** reportado en el trabajo de Morikawa et al. Sin embargo, es necesario evaluar la expresión de **PDGFR α** y **CD29** y la ausencia de **Ter119** y. Se espera que al evaluar el resto de los marcadores haya subpoblaciones con variaciones de inmunofenotipos, lo cual podría estar relacionado con distintos estados de diferenciación. Para cualquier población identificada, deben realizarse ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar su potencial de diferenciación.

En perspectiva, habrá que identificar mediante inmunofluorescencia la localización *in vivo* de estas poblaciones desde etapas más tempranas y a lo largo del desarrollo de la extremidad con el fin de conocer su destino celular. De acuerdo a los modelos propuestos para el desarrollo próximo-distal de la extremidad (Tabin & Wolpert, 2007; Ten-Berge et al., 2008), la zona indiferenciada del primordio de la extremidad podría estar enriquecida con alguna de estas poblaciones, sin embargo es posible identificar otros nichos en los que se establezcan de manera transitoria o definitiva las MSC.

A pesar del amplio estudio sobre la biología de las MSC para su uso terapéutico, poco se sabe acerca su comportamiento *in vivo* o de su origen embrionario. Hasta el momento se ha propuesto que las MSC tienen un origen mesodérmico (Dennis & Charbord, 2002), sin embargo, un reporte reciente sugiere el establecimiento transitorio de una población de MSC derivadas de la cresta neural, las cuales son posteriormente remplazadas por MSC de fuentes que aún no han sido identificadas (Takashima et al., 2007).

Uno de los aspectos más interesantes sobre identificar una población de MSC durante el desarrollo, es determinar si la troncalidad es una característica

intrínseca de las células del mesodermo, de no ser así, en qué momento se diferencian y adquieren una identidad troncal mesenquimal y una vez establecida esta población, si se mantiene durante el desarrollo hasta la vida adulta y si es esta población la que da origen a las MSC identificadas en etapas adultas. Los subsecuentes estudios a partir las dos poblaciones identificadas en este trabajo podrían dilucidar varias de estas incógnitas.

CONCLUSIONES

Evaluamos en primordios de extremidades anteriores y posteriores de ratón la presencia de poblaciones celulares que poseen un inmunofenotipo relacionado con la identidad de células troncales mesenquimales.

Logramos estandarizar el método de obtención de células de los primordios de la extremidad y determinamos mediante citometría de flujo la presencia de dos poblaciones de acuerdo a su tamaño y complejidad. Considerando ambas poblaciones como una sola, identificamos la expresión de los marcadores CD73, CD105, CD45, y Sca-1.

Adicionalmente, fue posible identificar dos poblaciones positivas a marcadores de células troncales mesenquimales, una con un inmunofenotipo CD73+, CD105+, CD45- y Sca-1- y una segunda población con inmunofenotipo CD105+, Sca-1+ y CD45-. A partir de ambas poblaciones, se continuará su caracterización para determinar si alguna de ellas es una población de células troncales mesenquimales.

APÉNDICE

Anticuerpos

Anticuerpo	Compañía	No. Cat.	Dilución
FITC Rat IgG2c,k isotype Ctrl	Biologend	400705	1:200
PE Rat IgG1,k isotype Ctrl	Biologend	400407	1:400
PerCP/Cy 5.5 Rat IgG2b,k isotype Ctrl	Biologend	400631	1:200
APC Rat IgG2a,k isotype Ctrl	Biologend	400511	1:200
PE/Cy7 Rat IgG2a, k Isotype Ctrl	Biologend	400631	1:100
APC/Cy7 Rat IgG2b, k Isotype Ctrl	Biologend	400623	1:100
FITC Rat IgG2c,k α -mouse CD90	abcam	ab25672	1:200
PE Rat IgG1,k α -mouse CD73	Biologend	127206	1:400
PerCP/Cy 5.5 Rat IgG2b,k α -mouse CD45	Biologend	103132	1:200
PE/Cy7 anti-mLy-6A/E (Sca-1)	Biologend	108114	1:100
APC Rat IgG2a,k α -mouse CD105	Biologend	120414	1:100
APC/Cy7 a-mCD117	Biologend	105826	1:100

Tabla 6. Lista de los anticuerpos utilizados, así como la compañía, número de catálogo y dilución utilizada.

Estreptavidinas

Estreptavidina	Compañía	No. Cat.	Dilución
FITC-Streptavidin	Biologend	405202	1:400
PE-Streptavidin	Biologend	405204	1:400
PerCP/Cy 5.5-Streptavidina	Biologend	4052143	1:400
PE/Cy7-Streptavidin	Biologend	405206	1:400
APC-Streptavidin	Biologend	405207	1:400
APC/Cy7- Streptavidin	Biologend	405208	1:400

Tabla 7. Lista de estreptavidinas acopladas a fluorocromos que fueron utilizadas para realizar las compensaciones. También se muestra la compañía, número de catálogo y dilución utilizada.

Soluciones

Amortiguador Hank 400 mL

1. En 395 ml de agua MilliQ estéril, disolver:
 - KCl 0.16 g
 - KH_2PO_4 0.024 g
 - NaCl 3.2 g
 - NaHCO_3 0.14 g
 - Na_2HPO_4 0.0192 g
2. Agregar 4 mL de una solución estéril de glucosa 5%
3. Ajustar a pH 7.
4. Aforar a 400 mL con agua MilliQ estéril.
5. Esterilizar usando un filtro de 0.2 μm .
6. En una campana de flujo laminar adicionar colagenasa tipo VI (.2%).
7. Alicuotar y guardar a -20 °C.

Solución de lisis ACK 1L

1. En 995 ml de agua MilliQ estéril, disolver:
 - NH_4Cl 8.024 g
 - KHCO_3 1.001 g
 - EDTA. $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.722 g
2. Ajustar el pH a 7.2-7.4.
3. Aforar a 1L.
4. Esterilizar usando un filtro de 0.2 μm .
5. Guardar a 4 °C.

Amortiguador para FACS

- PBS 1X.
 - 2% SFB
 - 0.02% Azida de Sodio.
1. Ajustar a pH 7.4
 2. Esterilizar usando un filtro de 0.2 μm .
 3. Guardar a 4 °C.

Citometría de flujo

Definición

La citometría de flujo es una herramienta poderosa para el análisis de parámetros múltiples en células individuales dentro de una población heterogénea.

El citómetro de flujo realiza estos análisis mediante la siguiente estrategia: Miles de células por segundo atraviesan un haz de laser cuya luz es dispersada conforme cada célula lo atraviesa. La luz dispersada es capturada y los datos de toda la muestra son reunidos para ser analizados estadísticamente mediante un software de citometría de flujo. La dispersión de luz es una consecuencia de diferentes características celulares como, el tamaño, la complejidad citoplásmica y la expresión de una o varias proteínas (mediante inmunofluorescencia).

Funcionamiento general del citómetro de flujo.

Los componentes básicos de un citómetro de flujo son: el sistema de fluido (Fig. 26a), el cual lleva la muestra a un punto denominado “punto de interrogación” (Fig. 27b; en dónde el láser y la muestra intersectan) y recolecta la desechos; el sistema del láser (Fig. 26c), que son la fuente de luz para evaluar la dispersión de luz y la fluorescencia; el sistema óptico (Fig. 26d), el cual recolecta y direcciona la luz; el sistema de detección (Fig. 26e), el cual recibe la luz dirigida por el sistema óptico; y el sistema periférico electrónico y de computo (Fig. 26f), los cuales convierten las señales de los detectores a datos digitales para poder realizar los análisis necesarios (Jaroszeski & Radcliff, 1999).

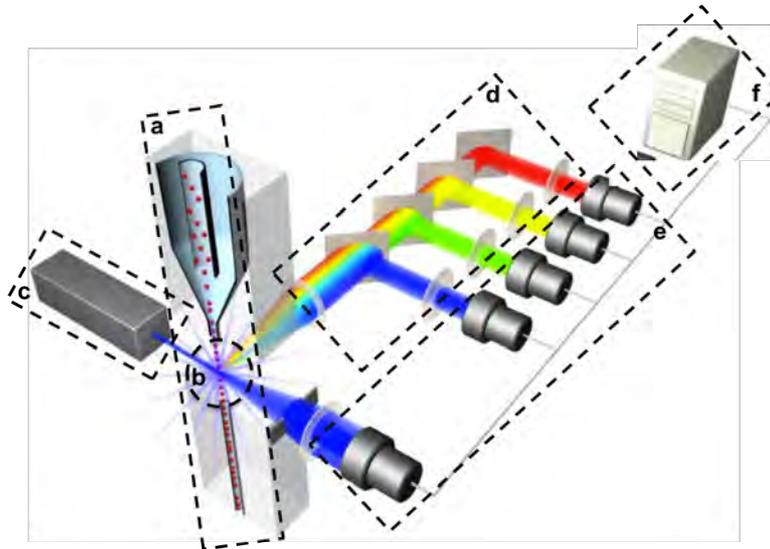


Figura 26. Componentes básicos de un citómetro de flujo. a) Sistema de fluido, b) punto de interrogación c) sistema de láseres, d) sistema óptico, e), sistema de detección y f) sistema periférico electrónico de computo. Sitio web accesado el 22 de septiembre de 2013.

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.

Dispersión frontal (Forward scatter).

Los citómetros de flujo pueden detectar células en un rango de tamaño entre 1 y 15 μm de diámetro, mediante el siguiente mecanismo: mientras la célula atraviesa el láser, el haz de luz, es refractado hacia todos los ángulos. La dispersión frontal (Fig. 27a), se refiere a la luz que es dispersada hacia el frente, la cual es proporcional al tamaño de la célula, por lo que este dato puede ser usado para cuantificar el tamaño. La dispersión frontal es capturada mediante un detector que cuantifica y convierte la intensidad de la luz en un voltaje.

La luz dispersa recibida por el detector, es traducida a un pulso de voltaje. La células pequeñas producen una pequeña cantidad de dispersión frontal y las células grandes producen una gran dispersión frontal, la magnitud del pulso de voltaje de cada célula es proporcional al tamaño de la célula (Fig. 28a). Si se realiza un histograma con todos los datos de una muestra, las células pequeñas aparecerán a la izquierda, las medianas en el centro y las grandes a la derecha (Fig.28b). Un histograma de la dispersión frontal es una representación gráfica de la distribución del tamaño dentro de la población.

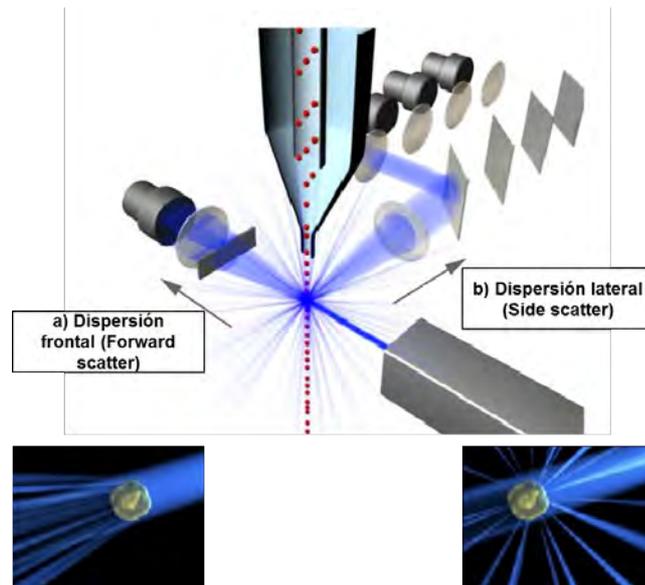


Figura 27. Dispersión de luz. A) Dispersión frontal. b) Dispersión lateral. Sitio web accesado el 22 de septiembre de 2013. http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.

Dispersión lateral (Side scatter).

Cómo se mencionó previamente, cuando una célula atraviesa el láser, la luz es dispersada en todos los ángulos, esta dispersión se debe a la granularidad y la complejidad de la estructura celular. La dispersión lateral de la luz es enfocada a través de un sistema de lentes y colectada por un detector independiente, usualmente colocado a 90° de la trayectoria del láser (Fig. 27a). Las señales colectadas por el detector de dispersión lateral, también pueden ser graficadas en un histograma unidimensional como se explicó previamente para la dispersión frontal.

Gráficas de dispersión y regiones.

Los histograma unidimensionales no son útiles para mostrar la complejidad de las poblaciones celulares, para poder observar esto es necesario utilizar dos dimensiones, es decir graficar la dispersión frontal y la dispersión lateral (Fig. 29).

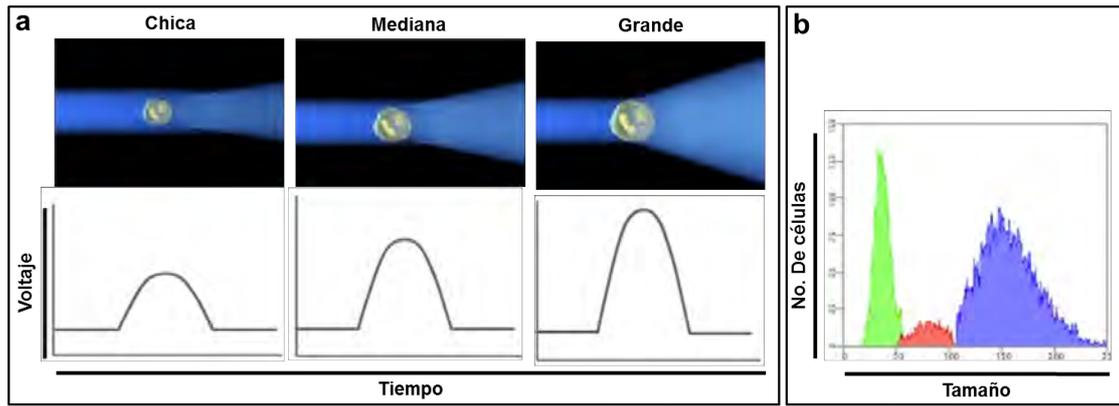


Figura 28. *Dispersión frontal.* a) La dispersión frontal es proporcional al tamaño de la célula y b) histograma de la FSC vs el número de eventos. Sitio web accesado el 22 de septiembre de 2013.

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.

En una muestra con una heterogeneidad de poblaciones, es posible seleccionar una de ellas al delimitar una región alrededor de la población deseada (Fig. 29), de esta manera es posible dirigir el análisis sobre la población de interés (Herzenberg et al., 2006).

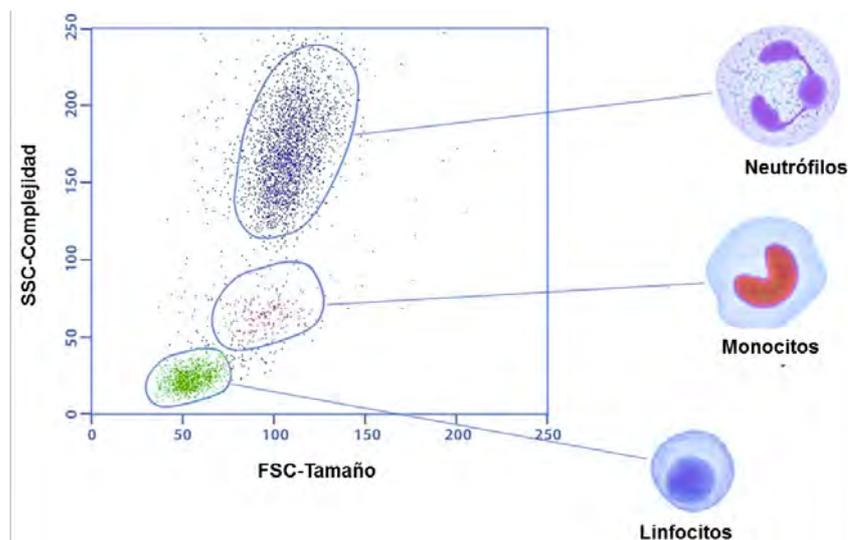


Figura 29. *Grafica tipo dot plot de dos dimensiones de una muestra de sangre periférica.* En el eje de las “x” se muestra el tamaño y el en eje de las “y” la complejidad. Cada punto representa una célula. Una población de interés puede ser seleccionada al trazar una región alrededor de ella (R1). Sitio web accesado el 22 de septiembre de 2013.

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.

Fluorescencia en la citometría de flujo.

Cuando un haz de luz incide sobre una molécula, sólo cierta longitud de onda será absorbida por ella, haciendo que sus electrones se exciten y aumenten su nivel de energía, posteriormente los electrones excitados regresan a su nivel basal de energía y la diferencia de energía entre el estado de excitación y el estado basal es emitida como luz de una longitud de onda diferente a la absorbida. A este fenómeno se le conoce como fluorescencia.

Una de las manera más frecuentes de estudiar las características de una célula involucra el uso de moléculas fluorescentes acopladas a anticuerpos (Fig. 30a). En este tipo de ensayo el anticuerpo es adicionado a la muestra de células a evaluar y se une específicamente a una molécula en la superficie celular o en el interior de la célula. Finalmente, cuando un láser con la longitud de onda adecuada incide sobre el fluoróforo, la señal fluorescente es emitida y detectada por el citómetro (Fig. 30b).

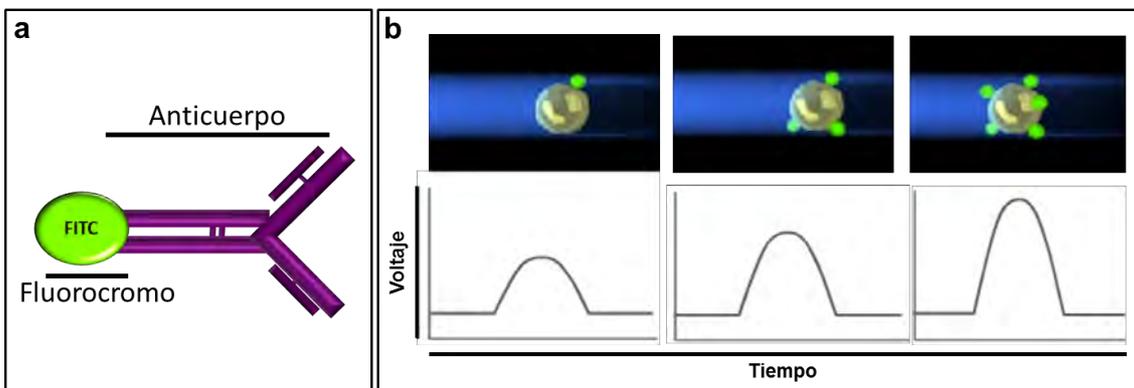


Figura 30. Fluorescencia en la citometría de flujo. a) Esquema representativo de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo (FITC). **b)** La señal fluorescente generada es dirigida al detector apropiado en donde se traduce en un pulso de voltaje proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida. Sitio web accesado el 22 de septiembre de 2013. http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.

Conforme las células pasan a través del láser, sólo aquellas marcadas con el anticuerpo acoplado a un fluoróforo emitirán una luz fluorescente, la cual sigue un patrón similar a la dispersión lateral y conforme la luz fluorescente emitida recorre ese camino, con ayuda de una serie de filtros y espejos (Fig. 26d) es dirigida hacia el detector apropiado (Fig. 26e). Los datos de fluorescencia son

colectados de la misma manera que la dispersión frontal y lateral, es decir, la señal fluorescente generada es detectada y traducida en un pulso de voltaje proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida (Fig. 30b). Estos datos también pueden ser representados en un histograma o una gráfica tipo dot plot (Fig. 31; L. a Herzenberg et al., 2002).

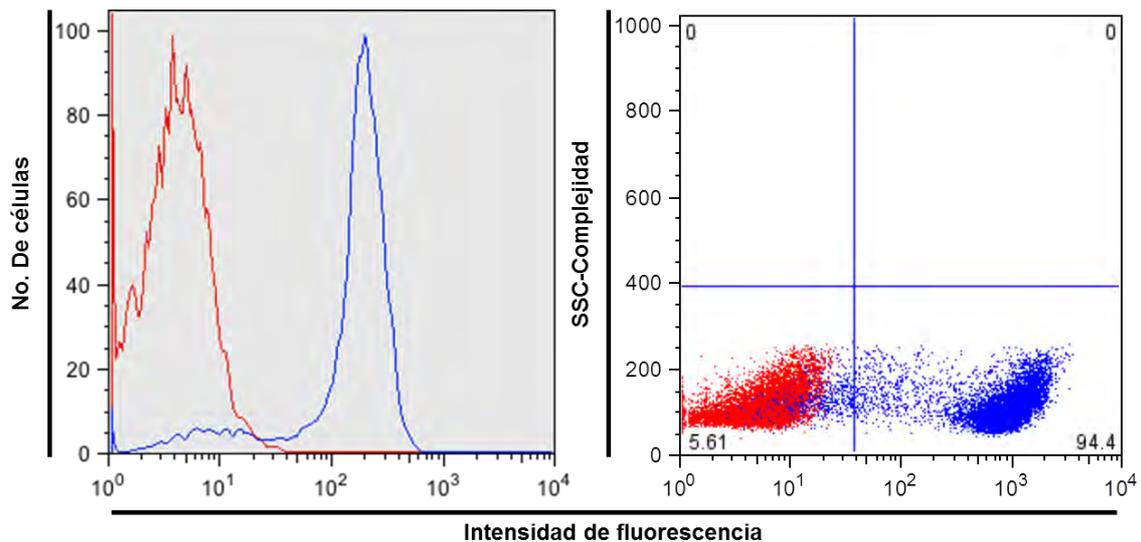


Figura 31. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia. En rojo se observa una muestra control sin anticuerpo y en azul la muestra a la que se adicionó el anticuerpo acoplado al fluorocromo. **a)** Histograma de la intensidad de fluorescencia vs el número de células. **b)** Dot plot de la intensidad de fluorescencia vs complejidad. Sitio web accesado el 22 de septiembre de 2013.

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.

Compensación para el uso de múltiples fluorocromos.

Es posible identificar más de una molécula a la vez mediante el uso anticuerpos acoplados a fluorocromos con diferente espectro de emisión, sin embargo, conforme aumenta el número de fluorocromos empleados, es imposible evitar la superposición de los espectros de emisión, no obstante mediante un proceso de llamado compensación es posible detectar únicamente la señal de cada fluorocromo en una muestra que contiene dos o más fluorocromos.

Para realizar la compensación, primero se debe contar con una muestra control positiva para cada fluorocromo. Cada muestra, es evaluada en el espectro de emisión del resto de los fluorocromos utilizados (canal de fluorescencia). Este proceso permite identificar los canales en los que hay sobreposición de la fluorescencia de emisión de un anticuerpo determinado. En una muestra con todos los anticuerpos, se resta en cada canal de fluorescencia la señal generada por la sobreposición de espectros. De esta manera el citómetro detecta únicamente la señal positiva verdadera (Tung et al., 2004).

REFERENCIAS

- Alessandri, G. et al., 2004. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet*, 364(9448), pp.1872–1883.
- Barbara, N.P., 1999. Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor-beta Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), pp.584–594.
- Barry, F. et al., 2001. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(2), pp.519–524.
- Barry, F.P. et al., 1999. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochemical and biophysical research communications*, 265(1), pp.134–139.
- Brons, I.G.M. et al., 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), pp.191–195.
- Calloni, R. et al., 2013. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem cells and development*, 22(9), pp.1455–1476.
- Caplan, A.I., 1994. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*, 21(3), pp.429–435.
- Cassiede, P. et al., 1996. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *Journal of bone and mineral research*, 11(9), pp.1264–1273.
- Chen, H. et al., 1998. Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nature genetics*, 19(1), pp.51–55.
- Chevallier, A., Kieny, M. & Mauger, A., 1977. Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *Journal of embryology and experimental morphology*, 41, pp.245–258.
- Christ, B., Jacob, H.J. & Jacob, M., 1977. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anatomy and embryology*, 150(2), pp.171–186.
- Dezawa, M. et al., 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *The Journal of clinical investigation*, 113(12), pp.1701–1710.

- Dominici, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), pp.315–317.
- Donovan, P.J. & de Miguel, M.P., 2003. Turning germ cells into stem cells. *Current opinion in genetics & development*, 13(5), pp.463–471.
- Dzierzak, E. & Speck, N. a, 2008. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunology*, 9(2), pp.129–136.
- Ehninger, A. & Trumpp, A., 2011. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*, 208(3), pp.421–428.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), pp.154–156.
- Fallon, J.F. & Crosby, G.M., 1975. Normal development of the chick wing following removal of the polarizing zone. *The Journal of experimental zoology*, 193(3), pp.449–455.
- Fernandez-Teran, M. & Ros, M., 2008. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *The International journal of developmental biology*, 52(7), pp.857–871.
- 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 and tissue kinetics*, 3(4), pp.393–403.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I. & Petrakova, K. V, 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), pp.381–390.
- Galli, A. et al., 2010. Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS genetics*, 6(4), p.e1000901.
- Herzenberg, Leonard a et al., 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical Chemistry*, 48(10), pp.1819–1827.
- Herzenberg, Leonore A et al., 2006. Interpreting flow cytometry data : a guide for the perplexed. *Nature immunology*, 7(7), pp.681–685.
- Ho, L. & Crabtree, G.R., 2010. Chromatin remodelling during development. *Nature*, 463(7280), pp.474–484.
- In't Anker, P.S. et al., 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells*, 22(7), pp.1338–1345.

- James E. Dennis, P.C., 2002. Origin and Differentiation of Human And Murin Stroma. *Stem Cell*, 20, pp.205–214.
- Jaroszeski, M.J. & Radcliff, G., 1999. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology*, 11(1), pp.37–53.
- Jiao, F. et al., 2012. Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cellular reprogramming*, 14(4), pp.324–33.
- Kardon, G., 1998. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development*, 125(20), pp.4019–4032.
- Kaufmann, P., 1992. The Anatomical Basis of Mouse Development. *San Diego: Academic Press* *Journal of Anatomy*.
- Kern, S. et al., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 24(5), pp.1294–12301.
- Kestendjieva, S. et al., 2008. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell biology international*, 32(7), pp.724–732.
- Kincade, P.W., Owen, J.J.T. & Rossi, M.I.D., 2002. Nature or nurture ? Steady-state lymphocyte formation in adults does not recapitulate ontogeny. *Immunological Reviews*, 187, pp.116–125.
- Kleinsmith, L.J. & Pierce, G.B., 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 24, pp.1544–1551.
- Kotton, D.N. et al., 2001. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*, 128(24), pp.5181–5188.
- Laiosa, C. V, Stadtfeld, M. & Graf, T., 2006. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annual review of immunology*, 24, pp.705–738.
- Lee, K.-D. et al., 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40(6), pp.1275–1284.
- Lewandoski, M., Sun, X. & Martin, G.R., 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature genetics*, 26(4), pp.460–463.
- Loomis, C.A. et al., 1996. The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*, 382(6589), pp.360–363.
- Mariani, F. V & Martin, G.R., 2003. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature*, 423(6937), pp.319–325.

- Méndez-Ferrer, S. et al., 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308), pp.829–834.
- Mizuochi, C. et al., 2012. Intra-Aortic Clusters Undergo Endothelial to Hematopoietic Phenotypic Transition during Early Embryogenesis A. Navarro, ed. *PLoS ONE*, 7(4), p.e35763.
- Morikawa, S. et al., 2009. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 206(11), pp.2483–2496.
- Morrison, S.J., Shah, N.M. & Anderson, D.J., 1997. Regulatory mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell*, 88, pp.287–298.
- Nadri, S. & Soleimani, M., 2007. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. *In vitro cellular & developmental biology*, 43(8-9), pp.276–282.
- Nöth, U. et al., 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 20(5), pp.1060–1069.
- Oatley, J.M. & Brinster, R.L., 2008. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, pp.263–286.
- Ode, a et al., 2011. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *European cells & materials*, 22(030), pp.26–42.
- Owen, M., 1988. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science. Supplement*, 10, pp.63–76.
- Pearse, R. V et al., 2007. A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Developmental biology*, 310(2), pp.388–400.
- Pelayo, R., Santa-Olalla, J. & Velasco, I., 2011. Células Troncales y Medicina Regenerativa. (1a ed.). México: Programa Universitario de Investigación en Salud, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Phinney, D.G. & Prockop, D.J., 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells*, 25(11), pp.2896–2902.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), pp.143–147.

- Prockop, D.J., 2009. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(6), pp.939–946.
- Ramalho-Santos, M. & Willenbring, H., 2007. On the origin of the term “stem cell”. *Cell stem cell*, 1(1), pp.35–38.
- Resta, R. & Thompson, L.F., 1997. T cell signalling through CD73. *Cellular Signalling*, 9(2), pp.131–139.
- Rhee, I. & Veillette, A., 2012. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nature Immunology*, 13(5), pp.439–447.
- Riddle, R.D. et al., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75(7), pp.1401–1416.
- Rousche, K.T. & Knudson, C.B., 2002. Temporal expression of CD44 during embryonic chick limb development and modulation of its expression with retinoic acid. *Matrix biology journal of the International Society for Matrix Biology*, 21(1), pp.53–62.
- Santos, T.M. et al., 2010. Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein. *Transplantation proceedings*, 42(2), pp.563–565.
- Saunders, J.W., 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *The Journal of experimental zoology*, 108(3), pp.363–403.
- Schoenwolf, G.C. et al., 2009. *Larsen's Human Embryology*. (4a ed.). Churchill Livingstone.
- Simmons, D.J. et al., 1991. Partial characterization of rat marrow stromal cells. *Calcified tissue international*, 48(5), pp.326–334.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A. & Caplan, A.I., 2009. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue engineering. Part A*, 15(7), pp.1751–1761.
- Spradling, A., Drummond-barbosa, D. & Kai, T., 2001. Stem cells find their niche. *Nature*, 414(6859), pp.98-104.
- Stappenbeck, T.S. & Miyoshi, H., 2009. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*, 324(5935), pp.1666–9.
- Sun, X., Mariani, F. V & Martin, G.R., 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 418(6897), pp.501–508.

- Sung, J.H. et al., 2008. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplantation proceedings*, 40(8), pp.2649–2654.
- Tabin, C. & Wolpert, L., 2007. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes & development*, 21(12), pp.1433–1442.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Takashima, Y. et al., 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129(7), pp.1377–1388.
- Te-Welscher, P. et al., 2002. 1 Patterning the limb before and after SHH. *Journal of anatomy*, 201(5), p.417.
- Ten-Berge, D. et al., 2008. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*, 135(19), pp.3247–3257.
- Tesar, P.J. et al., 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448(7150), pp.196–202.
- Till, J.E. & McCulloch, E.A., 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14, pp.213–22.
- Till, J.E. & McCulloch, E.A., 1980. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta*, 605(4), pp.431–59.
- Till, J.E., McCulloch, E.A. & Siminovitch, L., 1964. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, pp.29–36.
- Todorov, P. et al., 2010. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver. *Cell biology international*, 34(5), pp.455–462.
- Tung, J.W. et al., 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clinical immunology*, 110(3), pp.277–283.
- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9), pp.726–736.
- Wachtler, F., Christ, B. & Jacob, H.J., 1981. On the determination of mesodermal tissues in the avian embryonic wing bud. *Anatomy and embryology*, 161(3), pp.283–289.

- Wanek, N. et al., 1989. A staging system for mouse limb development. *The Journal of experimental zoology*, 249(1), pp.41–49.
- Welinder, E. & Murre, C., 2011. Ldb1, a new guardian of hematopoietic stem cell maintenance. *Nature immunology*, 12(2), pp.113–114.
- Zeller, R., López-Ríos, J. & Zuniga, A., 2009. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature reviews. Genetics*, 10(12), pp.845–858.
- Zuk, P.A. et al., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), pp.4279–4295.