



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**Generación de Extremidades Recombinantes con Células
Estromales Mesenquimales provenientes de Sangre de
Cordón Umbilical**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciado en Investigación Biomédica Básica**

P R E S E N T A :

Roberto Damián García García



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jesús Chimal Monroy
CIUDAD DE MÉXICO, 2021**



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.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo la convocatoria Fronteras de la Ciencia con Proyecto Número: 1887, titulado “Potencialidad de diferenciación y morfogenética de las células troncales adultas para formar estructuras esqueléticas complejas”.

Durante la realización de este trabajo recibí una Beca de Licenciatura Nivel I (Número de Registro: 29953) con cargo al proyecto CONACyT Fronteras de la Ciencia (Proyecto Número: 1887).

Co-dirección:

El presente trabajo se realizó bajo la Co-dirección de la Dra. Jessica Cristina Marín Llera.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Chimal Monroy, por su confianza depositada a lo largo de estos años y por dejarme indagar cada día en su laboratorio las maravillas de la Biología del Desarrollo.

A la Dra. Jessica Cristina Marín Llera, por su guía en la codirección de esta tesis. Por la enseñanza y guía en todas las técnicas que se desarrollaron en esta tesis. Por transmitirme la rigurosidad científica que la caracteriza para realizar cada experimento, y por su constante asesoría en la escritura de la tesis. Gracias también por su amistad en estos últimos años.

Al M. en C. Víctor Adrián Cortés Morales y al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por la colaboración en este proyecto y brindarnos acceso a las células utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, encargado de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por sus comentarios y ayuda para la adquisición y mejoramiento de las imágenes de esta tesis.

Al Dr. Omar Collazo Navarrete, y la Dra. Gilda Guerrero Flores, del Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos (LaNReGen) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el acceso a los equipos para la realización de las qPCRs.

Al jurado conformado por los Dres.: Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Susana Castro Obregón, Dr. Daniel Ríos Barrera y Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez, cuyos comentarios ayudaron a obtener la mejor versión de este trabajo.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo y Lic. Martha Cariño Aguilar, de la Biblioteca “Dr. Dionisio Nieto Gómez” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su apoyo en la adquisición de material bibliográfico a lo largo de mis estudios de Licenciatura.

DEDICATORIAS

A mi Mamá, María de los Ángeles, cuyo amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida ha hecho ser quien soy. Cada uno de mis éxitos son tuyos, siempre. Te amo mucho.

A mi Papá, Roberto, quien me ha enseñado con el ejemplo a perseguir mis sueños, y que no hay obstáculos en la vida que se puedan enfrentar y vencer. Gracias por tu amor y consejos. Te amo mucho.

A mi hermana, Adriana, quien ha sido mi ejemplo e inspiración. Gracias por enseñarme que cuando uno hace las cosas con esfuerzo y dedicación se puede lograr lo que sea. Te amo mucho.

A mi tío Ignacio (Nacho), quién nos dio a mi familia y a mí el regalo más grande que uno pueda tener. Nos cambiaste la vida. Siempre te estaré agradecido.

A mis padrinos, Victoria y Chuy (Q.E.P.D.) por ser un apoyo incondicional en la familia durante los momentos más difíciles. Muchas gracias por todo.

A Nicole, cuya amistad traspasa tiempo y fronteras. Gracias por motivarme y demostrarme que uno siempre debe luchar por lo que anhela. Por las aventuras vividas y las que nos esperan.

A mis amigos del laboratorio A-122 del IIB: Adriana Juárez, Juan Pablo, Quetzally y Iovalli. Por las enseñanzas en mis primeros pasos en un laboratorio de investigación, y las salidas llenas de risas.

A mis amigos del laboratorio BL-303 del IFC: Raúl, Ana Elena y Alan por su paciencia y consejos. Gracias por los momentos vividos durante mi estancia en ese laboratorio.

A mis amigos del laboratorio B-209 del IIB, los que están y los que estuvieron: Argelia, Jessica, Alonso, Estefanía, Dennet, Alexandra, Amaury, Mario, Francisco, Noel y Nancy. Por las risas y hacer amena la estancia en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de la generación LIBB: Maru, Mariana, Majo, Emmanuel y Karla. Gracias por motivarme a seguir adelante. Sé que les irá excelente.

A la Dra. Ana María Salazar Martínez, a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir, y al Dr. Jesús Chimal Monroy, quienes fueron mis tutores durante mi primera, segunda y tercera rotación de laboratorio, respectivamente. Gracias por sus enseñanzas y consejos. Por ser un ejemplo e inspiración para dedicarme al apasionante mundo de la ciencia.

ÍNDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS	8
II. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	9
III. RESUMEN	11
IV. INTRODUCCIÓN	13
1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS EXTREMIDADES	13
1.1 El establecimiento de la Identidad de la Extremidad y la Formación del Primordio ..	13
1.2 El Establecimiento y Activación de los Centros Señalizadores	16
1.2.1 La Cresta Ectodérmica Apical y el Crecimiento de la Extremidad.....	16
1.2.2 La Zona de Actividad Polarizante especifica el eje antero-posterior.	18
1.2.3 La especificación del eje dorso-ventral es controlada por el ectodermo dorsal.....	21
1.2.4 Los centros señalizadores interaccionan durante el desarrollo	23
1.3 Diferenciación celular durante el desarrollo de la Extremidad	25
1.3.1 Condrogénesis	26
1.3.2 Hipertrofia y Osificación Endocondral	30
1.3.3 Miogénesis.....	33
1.3.4 Tenogénesis	35
1.3.5 El desarrollo de los músculos y tendones de la extremidad están relacionados.....	36
2. EXTREMIDADES RECOMBINANTES	39
3. CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES	41
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	45
VII. HIPÓTESIS	46
VIII. OBJETIVOS	46
IX. DISEÑO EXPERIMENTAL	47
X. MATERIALES Y MÉTODOS	48
1. Obtención y cultivo de las MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical (MSC-SCU)	48
2. Extremidades Recombinantes con MSC-SCU	48
3. Tinción de esqueleto en extremidades recombinantes (ER)	50
4. Inclusión de muestras en parafina y cortes histológicos	50
5. Tinción de Hematoxilina y Eosina	51
6. Tinción con LysoTracker de las ER - SCU	51
7. Extracción de RNA y retrotranscripción de las ER - SCU	52
8. PCR en tiempo real	52

9.	Imunofluorescencias.....	53
10.	Hibridación in situ whole mount en ER – SCU.....	54
<i>XI.</i>	<i>RESULTADOS</i>	56
1.	Se pueden formar Extremidades Recombinantes con MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical (ER-SCU)	56
2.	Las ER-SCU disminuyen de tamaño conforme al tiempo	56
3.	Existe un proceso de muerte celular en el ectodermo de las ER-SCU 24 hpi que disminuye conforme al tiempo.	58
4.	A las 24 hpi no se detectó muerte celular mediada por apoptosis en las ER-SCU	58
5.	A las 24 hpi disminuye la expresión de Fgf8 en las ER - SCU	61
6.	Las ER-SCU no presentan una tinción de azul alciano aparente en los tiempos evaluados.....	61
7.	Las MSC – SCU presentan cambios morfológicos en las ER – SCU y una asociación a condensaciones mesenquimales.....	63
8.	En las ER-SCU 24 hpi se encuentran sobre-expresados genes asociados a la diferenciación de diversos linajes presentes en la extremidad.....	65
<i>XII.</i>	<i>DISCUSIÓN</i>	70
<i>XIII.</i>	<i>CONCLUSIONES</i>	80
<i>XIV.</i>	<i>PERSPECTIVAS</i>	80
<i>XV.</i>	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	81
<i>XVI.</i>	<i>ANEXOS</i>	101

I. LISTA DE ABREVIATURAS

P-D - Eje Próximo-Distal

A-P - Eje Antero-Posterior

D-V - Eje Dorso-Ventral

LPM - Placa Lateral del Mesodermo (Siglas en Inglés)

FGF - Factor de Crecimiento de Fibroblastos (Siglas en Inglés)

WNT – Contracción de las palabras en Inglés *Wingless* e *Int-1*

AER - Cresta Ectodérmica Apical (Siglas en Inglés)

PZ – Zona de Progreso (Siglas en Inglés)

ZPA – Zona de Actividad Polarizante (Siglas en Inglés)

Shh – Sonic Hedgehog

BMP – Proteína Morfogénica del Hueso (Siglas en Inglés)

ECM – Matriz Extracelular (Siglas en Inglés)

Ihh – Indian Hedgehog

Scx – Scleraxis

Mkx – Mohawk

Tnmd - Tenomodulina

ISH – Hibridación in situ (Siglas en Inglés)

ER – Extremidad Recombinante

MSC – Célula Mesenquimal Estromal (Siglas en Inglés)

MSC-SCU - Célula Mesenquimal Estromal proveniente de Sangre de Cordón Umbilical

ER – SCU - Extremidad Recombinante con MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical.

MHC – Complejo Principal de Histocompatibilidad (Siglas en Inglés)

HLA-I – Antígeno Leucocitario Humano de Clase I (Siglas en Inglés)

IF – Inmunofluorescencia

SEM – Error Estándar de la Media (Siglas en Inglés)

ANZ – Zona Necrótica Anterior (Siglas en Inglés)

PNZ – Zona Necrótica Posterior (Siglas en Inglés)

OP – Parche Opaco (Siglas en Inglés)

II. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Determinación del campo de la extremidad y la formación del primordio
- Figura 2. La AER y el Crecimiento de la Extremidad
- Figura 3. Establecimiento del eje Antero-Posterior por la ZPA
- Figura 4. El ectodermo especifica el eje Dorso-Ventral del primordio de la extremidad
- Figura 5. Integración entre los centros señalizadores en el primordio de la extremidad
- Figura 6. Las estructuras adultas de las extremidades se conservan en los tetrápodos
- Figura 7. Etapas de la Condrogénesis y la representación de la formación de un hueso por osificación Endocondral
- Figura 8. Osificación Endoncondral
- Figura 9. Genes maestros de diferenciación miogénica y tenogénica
- Figura 10. Extremidades Recombinantes
- Figura 11. Diseño Experimental del proyecto de investigación
- Figura 12. Protocolo RT-qPCR
- Figura 13. Se pueden formar Extremidades Recombinantes con MSC-SCU (ER-SCU)
- Figura 14. Existe una muerte celular en el ectodermo de las ER-SCU 24 hpi que disminuye conforme al tiempo
- Figura 15. A las 24hpi no se detectó una muerte celular mediada por apoptosis en las ER-SCU
- Figura 16. A las 24 hpi disminuye la expresión de *Fgf8* en las ER-SCU
- Figura 17. Las MSC-SCU presentan cambios morfológicos en las ER-SCU y una asociación a condensaciones mesenquimales
- Figura 18. A las 24 hpi las ER-SCU tienen sobre-expresados genes relacionados a diferenciación condrogénica
- Figura 19. A las 24 hpi se encuentran sobre-expresado *Scx*, gen relacionado a diferenciación tenogénica
- Figura 20. A las 24 hpi se encuentra sobre-expresado *Runx2*, gen asociado a diferenciación osteogénica
- Tabla 1. (Anexo II). Oligonucleótidos utilizados para las RT-qPCR
- Tabla 2. (Anexo III). Anticuerpos primarios y secundarios utilizados
- Figura 21. (Anexo V). Titulación del anticuerpo α -HLA en tejido de humano y pollo

Figura 22. (Anexo VI). Prueba de Oligonucleótidos en RNA Control de Humano

Figura 23. (Anexo VII). Prueba de la Sonda *Fgf8* en embriones de pollo en diferentes etapas de desarrollo

III. RESUMEN

Las Células Estromales Mesenquimales (MSC) son una población celular que bajo ciertos estímulos *in vitro* se diferencia hacia distintos linajes incluyendo osteocitos, adipocitos y condrocitos. Estas células son originadas a partir de la capa germinal mesodérmica y se han podido aislar de varias fuentes humanas adultas, fetales y embrionarias. En los últimos años, se han usado las MSC cultivadas *in vitro* en diferentes estudios de terapia celular. Sin embargo, aún no están claros los eventos moleculares que median la diferenciación de estas células, ni su capacidad de formar estructuras tridimensionales *in vivo*, ya que sus estudios se han limitado a placas de cultivo. Antes de usar las MSC en terapias celulares es necesario comprender los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación de estas células hacia los distintos linajes y la capacidad morfogenética que puedan tener. Para ello, en este trabajo se estudió la capacidad de diferenciación de las MSC de Sangre de Cordón Umbilical de Humano por una exposición de señales embrionarias características de la morfogénesis de extremidades con la técnica de Extremidades Recombinantes. Esta técnica permite formar una estructura parecida a la extremidad, donde se mantienen dos centros señalizadores del ectodermo importantes durante el desarrollo. Esta técnica ha permitido estudiar procesos de diferenciación y formación de patrones de las células del mismo primordio de la extremidad por lo que es un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares de especificación de las MSC en un contexto *in vivo*. Como resultados se pudieron obtener Extremidades Recombinantes interespecie pollo/humano, las cuales sobrevivieron por lo menos 72 horas post implantación (hpi). Aunque la primera observación fue un decremento longitudinal de la estructura conforme al tiempo, que se relaciona con la presencia de cuerpos acídicos y una pérdida de expresión de *Fgf8* del ectodermo a las 24 hpi, las MSC pueden sobrevivir en el sistema al no presentar marcadores de muerte celular mediada por apoptosis. La caracterización histológica de estas estructuras mostró una condensación mesenquimal a las 72 hpi, evento celular importante para la generación de estructuras esqueléticas complejas durante el desarrollo de la extremidad. Al evaluar la expresión de genes maestro de diferenciación hacia diversos linajes celulares, se encontró que a las 24 hpi las MSC se encuentran comprometidas hacia los linajes osteogénico, condrogénico y tenogénico; siendo este último el de mayor grado. Este trabajo abre brecha al demostrar que no solamente se pueden utilizar células derivadas de los componentes mesodérmicos de los primordios de las

extremidades en el sistema de Extremidades Recombinantes, si no también células ya caracterizadas de poseer una capacidad de diferenciación mesengénicas *in vitro*, y así poder evaluar su capacidad morfogenética y diferenciación de manera tridimensional.

IV. INTRODUCCIÓN

1. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS EXTREMIDADES

Los tetrápodos tienen dos pares de extremidades que emergen en posiciones fijas a lo largo del eje rostro-caudal del cuerpo. Las extremidades son estructuras muy complejas ya que presentan músculos y huesos, con tendones y ligamentos organizados y dispuestos de una manera particular. Además, se encuentran innervadas, vascularizadas y cubiertas con piel que a su vez cuenta con apéndices característicos como las uñas y vellosidades. La intrincada anatomía que presenta hace que el desarrollo de la extremidad sea altamente coordinado en procesos de morfogénesis y diferenciación celular. La formación de las extremidades inicia durante el desarrollo embrionario con el surgimiento de dos pares de primordios compuestos por células mesodérmicas recubiertas por una capa de células ectodérmicas. Estas células al diferenciarse generan los distintos tipos celulares que conforman la extremidad (Wachter et al., 1981). El estudio del desarrollo de las extremidades se puede dividir en 4 etapas: 1) el establecimiento de la identidad de la extremidad y la formación del primordio; 2) el establecimiento y activación de los centros señalizadores; 3) la diferenciación celular comenzando con una condensación mesenquimal, formación de condrocitos, además de la morfogénesis; y 4) el crecimiento, segmentación, regulación de la identidad digital y la maduración de la extremidad (revisado en: Marín-Llera et al., 2019).

1.1 El establecimiento de la Identidad de la Extremidad y la Formación del Primordio

Los primordios de las extremidades anteriores y posteriores se forman en áreas específicas a lo largo del eje anteroposterior (A-P) del embrión conocidas como “Campos de la Extremidad”. Los primordios de las extremidades anteriores surgen en la transición torácica/cervical de la columna vertebral entre las somitas 15-20 del embrión del pollo, y los primordios de las extremidades posteriores surgen en la transición sacrolumbar que corresponden a un posicionamiento entre las somitas 25/26 – 31/32 del embrión de pollo (Burke et al., 1995). El mesodermo que forma al primordio de la extremidad proviene de la placa lateral del mesodermo (LPM, por sus siglas en inglés “Lateral Plate Mesoderm”). Experimentos clásicos han mostrado que las regiones de la LPM están determinadas a formar

extremidades mucho antes que los primordios sean visibles. En contraste, el ectodermo del primordio de la extremidad no está determinado ya que puede ser reemplazado por ectodermo de otras regiones del embrión y aún así proveer un ambiente adecuado para un desarrollo normal (Balinski, 1965).

Genes de la familia *Hox*, en específico del clúster *HoxC*, tienen patrones de expresión restringidos y bien delimitados a lo largo de la LPM del flanco del embrión. Éstos especifican los niveles a los cuales el primordio de la extremidad aparecerá, y con ello, su identidad (Cohn et al., 1997). Los genes *Hoxc4* y *Hoxc5* están mayormente expresados en el mesénquima del área presuntiva de los primordios anteriores (Savard et al., 1988), *Hoxc9*, *Hoxc10*, y *Hoxc11*, están predominantemente expresados en el mesénquima del área presuntiva para las extremidades posteriores (Savard et al., 1988; Tabin, 1989), y la expresión de *Hoxc6* y *Hoxc8* correlaciona con el área interprimordio (**Figura 1-A**). Hoy en día, no hay evidencia funcional sobre la participación de los genes *Hox* en la regulación de la formación de los primordios ya que ratones donde se eliminó el clúster *HoxC* no presentan defectos en la posición de los primordios (Suemori & Noguchi, 2000). Esta observación no quita la posibilidad que estos genes participen en la determinación del campo de la extremidad en colaboración con otros genes redundantes, sobretodo ahora que hay evidencia de una expresión colinear de los genes *Hox* cuando la LPM se forma progresivamente durante la gastrulación (Moreau et al., 2019).

Los genes *Hox* son responsables de promover la expresión de dos factores de transcripción de la familia T-box, *Tbx5* y *Tbx4*, y del factor de transcripción homeótico *Pitx1*. Estos genes tienen patrones de expresión en la LPM y estudios funcionales sugieren que son consistentes en una participación para determinar la posición de las estructuras anteriores y posteriores (**Figura 1-B**) (Simon, 1999). *Tbx5* se expresa en los campos de las extremidades anteriores, pero no posteriores; mientras *Tbx4* y *Pitx1* son expresados en las regiones posteriores, pero no anteriores tanto en embriones de ratón como de pollo (Duboc & Logan, 2011a). *Tbx5* y *Tbx4* tienen roles equivalentes y son esenciales para el inicio de la formación de los primordios anteriores y posteriores, respectivamente porque inducen la expresión local

de genes que codifican para los Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) que inician la formación del primordio.

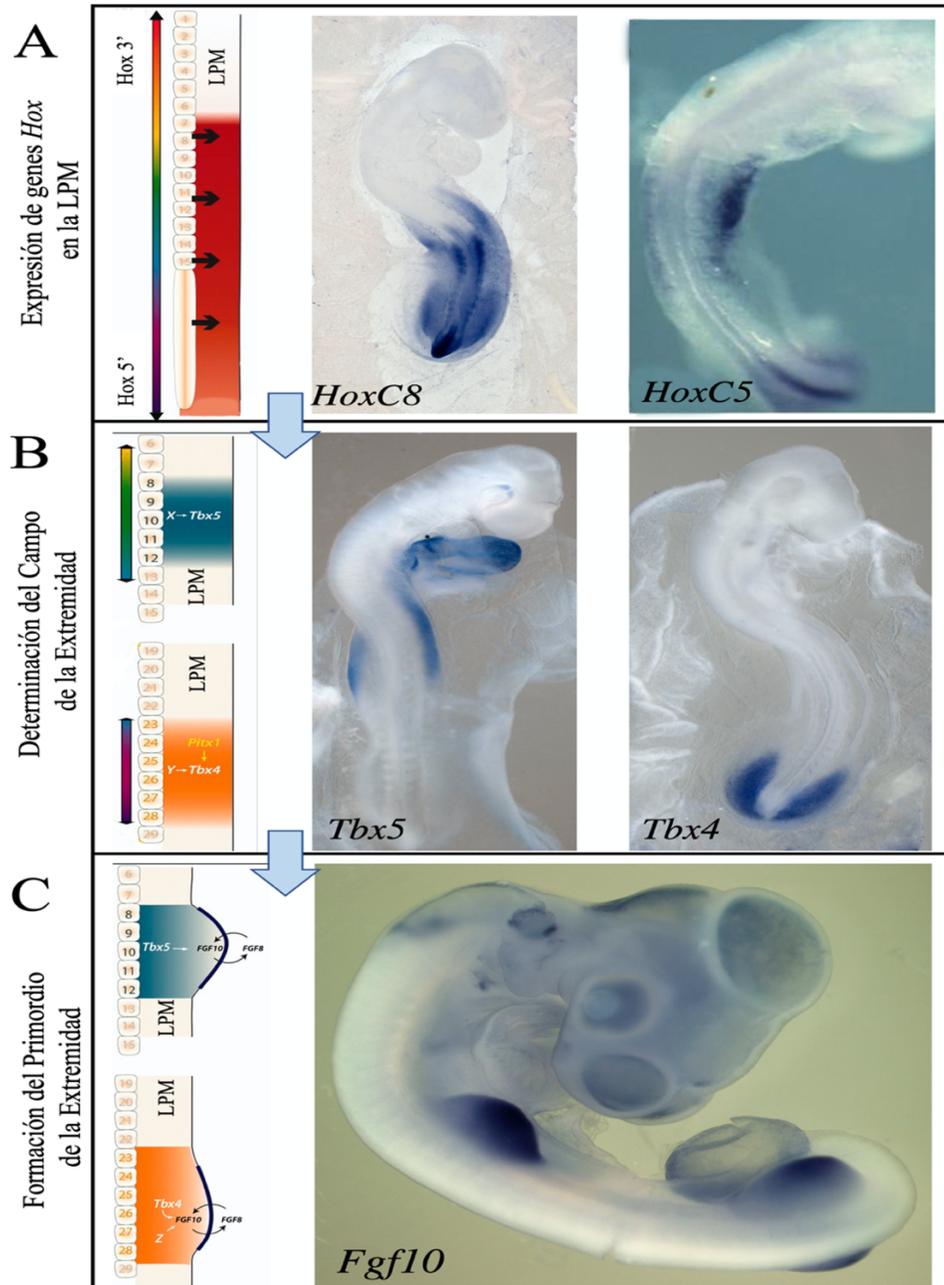


Figura 1. Determinación del campo de la extremidad y la formación del primordio. (A) Una combinación en la expresión de los genes *Hox* a lo largo de la LPM determina la posición donde se desarrollarán las extremidades anteriores y posteriores activando la expresión de los factores *Tbx*. La expresión de los genes *Hox* 3' se localiza en las zonas más anteriores, y los genes *Hox* 5' en las zonas posteriores. Se muestran ISH de *HoxC8* en un embrión de pollo etapa 17HH, y *HoxC5* en embrión de etapa 16HH; (B) La expresión de *Tbx5* se localiza en el campo de la extremidad anterior, y la expresión de *Tbx4* en el campo de la extremidad posterior. La expresión del *Pitx1* también se requiere en la región posterior. Se muestran expresiones de *Tbx5* en un embrión de etapa 17HH, y *Tbx4* en

embrión etapa 15HH. (C) TBX4 y TBX5 regulan la expresión de *Fgf10* que induce la formación del primordio. Se muestra la expresión de *Fgf10* en un embrión de pollo etapa 20HH. Modificado de (Duboc & Logan, 2011b). Las ISH fueron obtenidas del Atlas GEISHA (Gallus Expression *in Situ* Hybridation Analysis).

Los factores FGF regulan el inicio de la formación del primordio como lo demuestra la aplicación local de FGF8 en la región presuntiva del interprimordio de la LPM (en un área entre las somitas 20 y 26, entre etapas de desarrollo 13 a 17 HH). FGF8 es suficiente para inducir la formación de una extremidad ectópica completa (Cohn et al., 1995). Este y otros experimentos no sólo explicaron la señalización por FGF como punto crítico para la formación del primordio, sino que también demostraron que los ligandos de FGF, actuando en un periodo de tiempo corto bien establecido, son suficientes para establecer una serie de eventos que llevarán a la formación de una extremidad madura (Ohuchi et al., 1997).

FGF10 es el ligando que inicia el desarrollo de la extremidad y su expresión en los campos de la extremidad de la LPM está controlado por los factores TBX (**Figura 1-C**). Ambos genes controlan la proliferación de las células del epitelio celómico del campo de la extremidad, e inician la transición epitelio-mesénquima de estas células para formar el primordio (revisado en: Gros & Tabin, 2014). En embriones de ratón, la deficiencia del gen *Fgf10* (*Fgf10*^{-/-}), o del dominio parecido a la Inmunoglobulina III del gen que codifica para su receptor *Fgfr2* (*Fgfr2* ^{Δ IgIII/ Δ IgIII}), no forman los primordios de las extremidades tanto anteriores como posteriores (Min et al., 1998; Xu et al., 1998).

1.2 El Establecimiento y Activación de los Centros Señalizadores

1.2.1 La Cresta Ectodérmica Apical y el Crecimiento de la Extremidad

En la parte más distal del primordio se encuentra un área especializada del ectodermo conocida como Cresta Ectodérmica Apical (AER, por sus siglas en inglés “Apical Ectodermal Ridge”), que corre a lo largo del límite del ectodermo dorsal y ventral (**Figura 2**). Esta estructura se compone de células columnares pseudoestratificadas en el embrión de pollo y un epitelio poliestratificado en el embrión de ratón (revisado en: Marian Fernandez-Teran et al., 1999). Sin embargo, es necesario recalcar que dicha estructura es altamente

dinámica y tiene constantes cambios morfológicos: en el primordio del ala de un embrión de pollo, por ejemplo, la AER es visible en la etapa 18HH (HH, según Hamburger & Hamilton, 1951) cuando las células del ectodermo distal adquieren una forma columnar que las hace diferentes al resto de las células cuboidales del ectodermo; y es hasta la etapa 20HH que la AER adopta una estructura de epitelio pseudoestratificado (W. L. Todt & Fallon, 1984; William L. Todt & Fallon, 1986).

En respuesta a la señalización por FGF10 en la inducción del primordio de la extremidad, el ectodermo adyacente empieza a expresar *Fgf8* y forma la AER. Un loop de retroalimentación positiva es establecido entre el mesénquima del primordio y la AER. FGF8, cuya distribución sólo se encuentra en la AER (**Figura 2-A**), mantiene a su vez la expresión de *Fgf10* en el mesénquima. Por ello, la señalización de FGF establece y mantiene la región de la AER (Mariani et al., 2008).

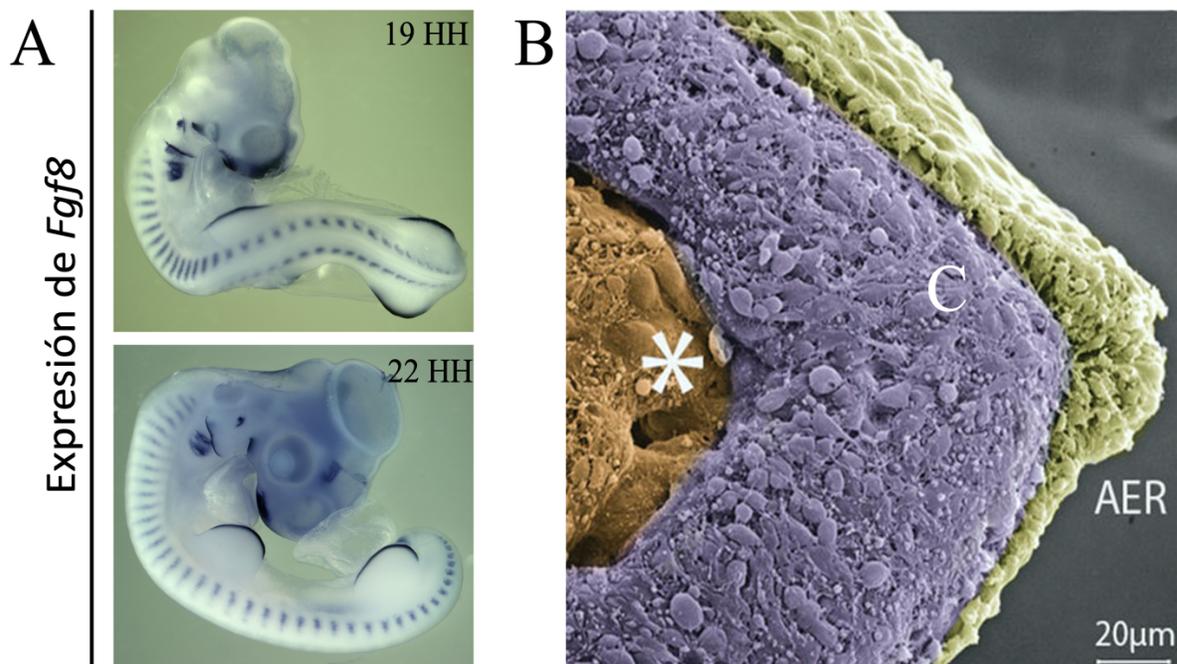


Figura 2. La AER y el Crecimiento de la Extremidad. (A) Se muestran ISH de *Fgf8* en embriones de etapas 19HH y 22HH. FGF10 induce la expresión del *Fgf8* en el ectodermo, creando un loop de retroalimentación positiva con *Fgf10* que forma y mantiene la AER hasta etapas posteriores. Se muestran ISH de *Fgf8* en embriones de etapas 19 HH y 22HH. Las imágenes se obtuvieron del Atlas GEISHA. (B) Microscopía Electrónica de Barrido de una sección sagital del primordio de la extremidad posterior de un embrión de pollo etapa 23HH. Se marca en amarillo la AER. (C) La zona indiferenciada se muestra en morado, y en naranja la zona de células comprometidas. El asterisco indica la Vena Marginal, que delimita la zona indiferenciada de la zona comprometida. Modificado de (Marín-Llera et al., 2019).

La actividad de la AER en el desarrollo de la extremidad se demostró por experimentos en los cuales ésta fue removida de forma quirúrgica y el crecimiento del primordio se redujo considerablemente, además que dio como resultado una extremidad truncada (Saunders & Gasseling, 1968). De forma interesante, el grado de truncamiento se correlaciona con la etapa en la cual la AER era removida: en etapas más tempranas se trunca el desarrollo en zonas más proximales, demostrando así la importancia de la señalización de la AER en el crecimiento próximo-distal de la extremidad, ya que esta estructura mantiene la proliferación y supervivencia de las células mesenquimales adyacentes a ella (Zwilling, 1956).

Para explicar la formación secuencial de los elementos próximo-distales de la extremidad, Wolpert y colaboradores propusieron que existe una zona que se encuentra justo debajo de la AER que denominaron Zona de Progreso (PZ, del inglés “Progress Zone”). Ésta es una región compuesta de células mesenquimales indiferenciadas, las cuáles conforme se alejan de la influencia de las señales que emite la AER inician el proceso de diferenciación hacia diversos linajes presentes en la extremidad (Wolpert, 2002)(**Figura 2-C**).

1.2.2 La Zona de Actividad Polarizante especifica el eje antero-posterior.

La especificación de la información posicional de las células a lo largo del eje A-P de la extremidad se refleja directamente en la identidad de los dígitos. Un ala de pollo normal desarrolla tres dígitos numerados como 2, 3 y 4, mientras que un humano desarrolla 5 que se enumeran del 1 al 5 (**Figura 3-A**).

La parte del primordio que especifica el eje A-P de la extremidad es una región del mesodermo localizada en el margen posterior denominada Zona de Actividad Polarizante (ZPA, por sus siglas en inglés “Zone of Polarizing Activity”). Cuando la ZPA de un primordio temprano del ala de pollo se trasplanta al margen anterior de otro primordio hospedero, da como resultado una duplicación en el número de dígitos organizados en una

conformación de “espejo”, ya que el patrón resultante de dichos dígitos, desde la parte anterior a la posterior, es decir 4, 3, 2, 2, 3, y 4 (**Figura 3-B**). También, trasplantes interespecies dan el mismo resultado: cuando se posiciona parte del mesénquima posterior del primordio de un mamífero al margen anterior de un primordio del ala de pollo, se repite la duplicación y organización de los dígitos al igual que en el ejemplo anterior (C. Tickle et al., 1976). Aunado a ello, los dígitos resultantes siguen siendo de pollo, lo cual indica que, aunque la actividad polarizante se conserva en todos los vertebrados, la interpretación depende de las células que responden a las señales.

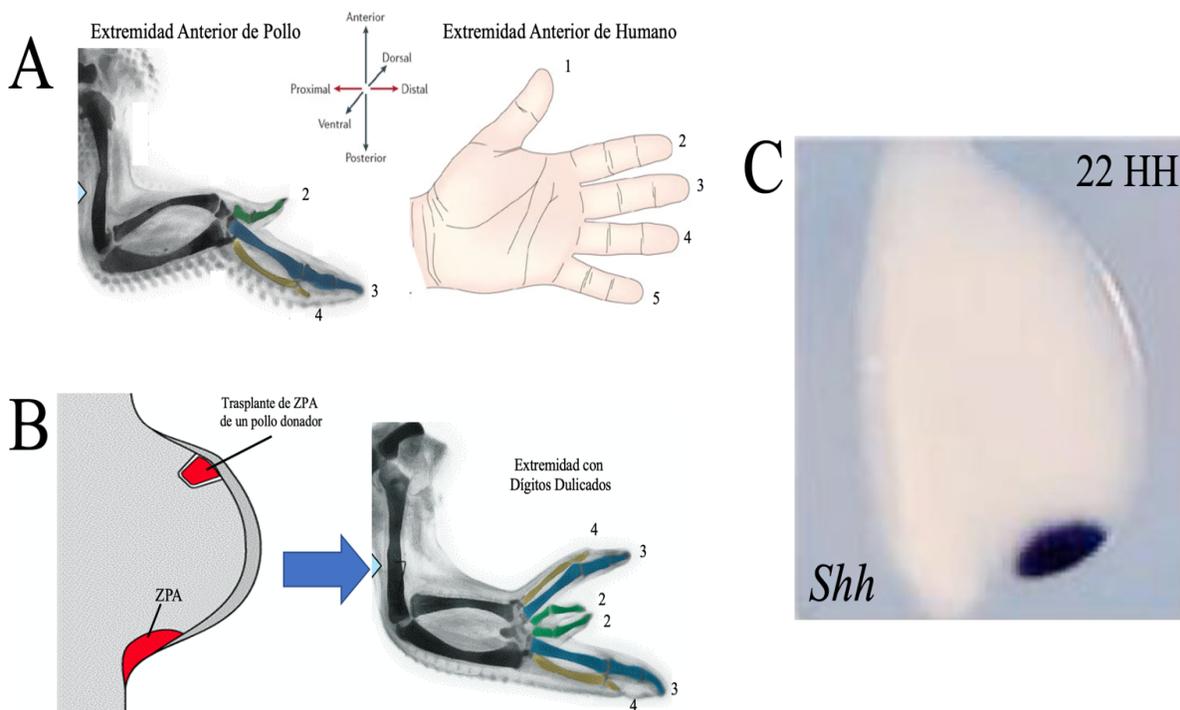


Figura 3. Establecimiento del eje Antero-Posterior por la ZPA. (A) Ejes anatómicos en las extremidades de dos vertebrados: humano y pollo, indicando la identidad de los dígitos. En el caso de la extremidad de pollo, se marca en verde el dígito 2, en azul el dígito 3 y en amarillo el dígito 4. (B) Experimento clásico de trasplante de la ZPA al margen anterior de un primordio receptor, dando como resultado una duplicación de los dígitos en forma de espejo. Se conserva el mismo código de colores que en el inciso anterior. (C) Patrón de expresión de *Shh* en un primordio del ala de un embrión en etapa 22HH, lo cual indica la ZPA. Modificado de (Cheryll Tickle, 2006). ISH obtenida del Atlas GEISHA.

Cuando se buscó a la molécula dentro de la ZPA encargada de establecer el patrón A-P de las extremidades de los vertebrados se encontró a la proteína secretada Sonic Hedgehog (SHH) (**Figura 3-C**). SHH es el morfógeno de la ZPA, ya que está distribuida en gradiente

desde la parte posterior hacia la anterior. Además, se observó que fibroblastos cultivados y transfectados con un retrovirus que contenía el gen *Shh* adquirirían las propiedades de la región polarizante, ya que, si estas células transfectadas se trasplantan al margen anterior de un primordio receptor, también se desarrollan las duplicaciones tipo “espejo” (Riddle et al., 1993). Asimismo, una perla embebida con la proteína SHH colocada en el margen anterior de un primordio receptor da el mismo resultado (Yang et al., 1997).

Sin embargo, estudios anteriores detectaron al ácido retinoico como el primer compuesto definido que mimetizaba la señalización de la ZPA. Cuando se aplicaba en el margen anterior de un primordio, también producía extremidades con duplicaciones en los dígitos (Cohn et al., 1995). Posteriormente, se demostró que el ácido retinoico induce la expresión de *Hoxb8* (Charité et al., 1994), cuyo producto proteico regula la expresión de *Hand2* y éste la expresión de *Shh* en la zona anterior del primordio (Charité et al., 2000; Fernandez-Teran et al., 2000). La inducción de la expresión en forma de gradiente de todos los genes anteriores explica las duplicaciones observadas.

Componentes importantes en la señalización de Hedgehog son los genes *Gli*. Éstas tres proteínas presentes en los vertebrados, GLI1, GLI2, y GLI3, son los efectores transcripcionales de la señalización por SHH. Análisis en los embriones knock-outs completos de los genes *Gli* muestran que en específico *Gli3*, tiene un rol importante en el establecimiento del eje A-P de la extremidad al regular de forma negativa la expresión de *Shh* en el mesodermo anterior, restringiendo su expresión sólo al mesodermo posterior del primordio de la extremidad. El ratón deficiente en dicho gen (*Gli3*^{-/-}) presenta extremidades con polidactilia y desarrolla, en promedio, 8 dígitos; en cambio, los ratones deficientes en *Gli1* y *Gli2* muestran extremidades normales (Litingtung et al., 2002).

Como se vio en esta sección, los trasplantes de la ZPA cambian el patrón y número de dígitos en la extremidad. Pero otras de las consecuencias de transplantar la región posterior a la región anterior es el aumento de la proliferación celular (Cooke & Summerbell, 1980) y del tamaño del primordio para acomodar los dígitos extras (Tickle et al., 1975). Esto también se acompaña de un incremento del tamaño de la AER, por lo que se postuló que la ZPA

regula la producción de un factor en el mesénquima posterior que actúa en el mantenimiento de la AER en la zona distal del primordio (Zwilling, 1956).

1.2.3 La especificación del eje dorso-ventral es controlada por el ectodermo dorsal y ventral

Las extremidades tienen un patrón bien definido a lo largo del eje dorso-ventral: por ejemplo, en las aves, las plumas largas se encuentran en la superficie dorsal, mientras que en los mamíferos como los ratones y humanos, se encuentran vellosidades y uñas; también, en todos los tetrápodos los músculos flexores se desarrollan en el lado ventral, y los extensores en el lado dorsal.

El estudio y caracterización de la formación del patrón dorso-ventral en el mesodermo se realizaron con experimentos donde se recombinan ectodermos del primordio de la extremidad izquierda con mesodermo de primordios de la extremidad derecha. De este modo, el eje D-V del ectodermo se voltea y se deja intacto al eje P-D. Después de implantarlas en un embrión receptor y dejarlas desarrollar, se observaron que las estructuras proximales que se formaban correspondían a una polaridad D-V normal; en cambio, las estructuras de las zonas distales tenían una polaridad D-V revertida (Geduspan & MacCabe, 1987; MacCabe et al., 1974). Con esto, se demostró que el ectodermo que cubre los lados del primordio especifica el eje dorso-ventral del primordio de la extremidad.

Los genes que controlan el establecimiento del eje dorso-ventral en las extremidades de los vertebrados han sido indentificados tras modificaciones genéticas en ratones. Mutaciones que inactivan al gen *Wnt7a*, resulta en el desarrollo de extremidades con doble polaridad ventral, siendo ambas mitades imágenes espejo (Gavin et al., 1990; Parr et al., 1993). Como el gen *Wnt7a* está expresado en el ectodermo dorsal (**Figura 4-A**) se ha propuesto que, durante el desarrollo normal, el primordio tenga un estado inicial uniforme del mesénquima y posteriormente sea modificado dorsalmente por la proteína WNT7, que es secretada por el ectodermo dorsal, difunda en el primordio y cause un cambio en la polaridad

(Gavin et al., 1990; Parr et al., 1993). Una de las funciones de WNT7A es inducir la expresión del factor de transcripción *Lmx1b* en el mesénquima adyacente al ectodermo dorsal, que conlleva a la especificación de dichas células a linajes dorsales (Chen et al., 1998).

Por otro lado, el ectodermo ventral es caracterizado por la expresión del gen *Engrailed1* (*En1*) (**Figura 4-B**). Mutaciones que disminuyen la funcionalidad de *En1* resulta en una expresión de *Wnt7a* en todo el mesénquima (tanto ventral como dorsal), dando como resultado una extremidad con doble polaridad dorsal (Logan et al., 1997). La expresión de *En1* en el ectodermo ventral está regulado por la señalización de BMP. Ratones dobles knock-outs condicionales (bajo el promotor de *Prx1*) *Bmp2/Bmp4*; o *Bmp2/Bmp7* tienen en común la pérdida de la polaridad dorso-ventral (Bandyopadhyay, et al., 2006), y el incremento de Nogina, antagonista de Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMP, por sus siglas en inglés “Bone Morphogenetic Protein”), en la zona preseuntiva del primordio de la extremidad pollo entre etapas 10 HH, resulta en una ausencia de expresión de *En1* en el ectodermo ventral de los primordios de las extremidades. En cambio, la sobreexpresión de los receptores de BMP, *Bmpr1a* y *Bmpr1b* en la misma etapa, resulta en una expresión ectópica de *En1* en el ectodermo dorsal y una pérdida de expresión de *Wnt7a* y *Lmx1* (Pizette et al., 2001).

Análisis de la progenie de células marcadas en primordios de ratón revelaron la compartimentalización en el eje dorso-ventral del mesénquima: la progenie de las células dorsales se restringe a la mitad dorsal, y la progenie de las células ventrales a la mitad ventral (Arques et al., 2007). Se ha propuesto que dicha compartimentalización del mesénquima en el eje D-V sirve como control de la expresión génica; *Lmx1b*, por ejemplo, está expresado exactamente en el compartimento dorsal, especificando dicho eje en el mesénquima del primordio. Esto se confirmó con la expresión ectópica de *Lmx1b* en el mesodermo ventral que resulta en células adoptando destinos dorsales, dando lugar a una extremidad en espejo (Riddle et al., 1995).

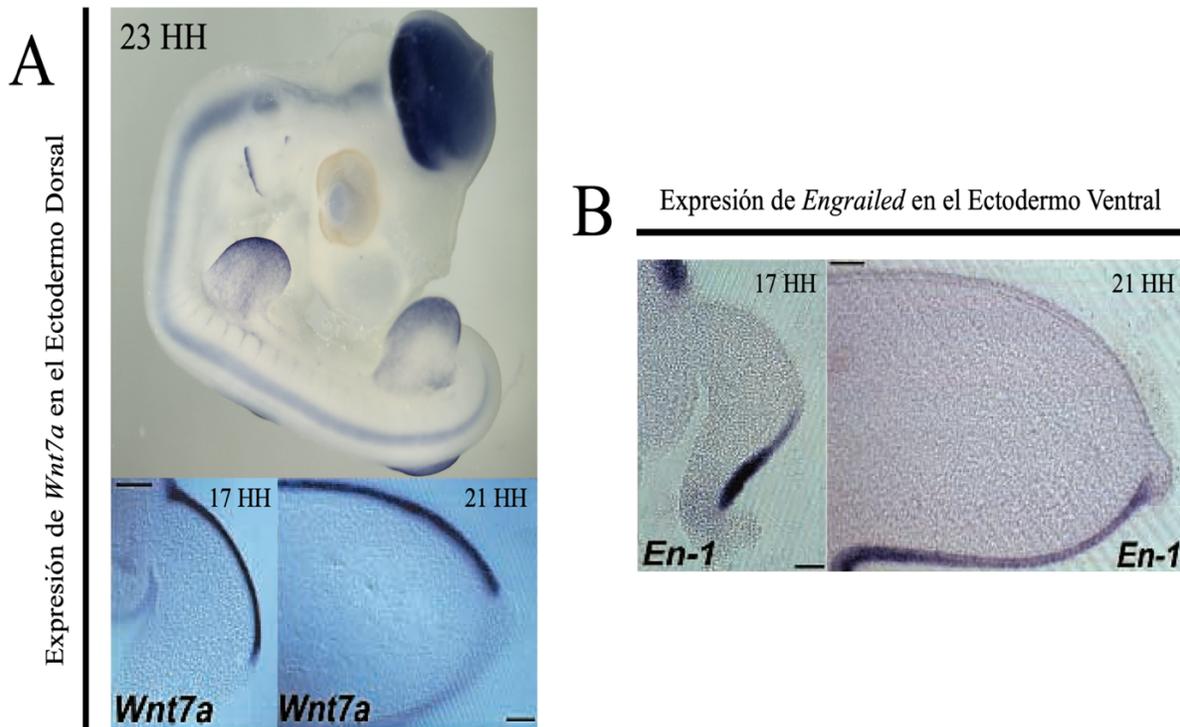


Figura 4. El ectodermo especifica el eje dorso-ventral del primordio de la extremidad. (A) Patrones de expresión de *Wnt7a* en el ectodermo dorsal. La Hibridación in situ Whole Mount con el embrión en etapa 23HH se obtuvo del Atlas GEISHA. (B) Patrón de expresión de *Engrailed* en el ectodermo ventral. Se muestran cortes longitudinales del primordio de la extremidad en etapas 17HH y 22HH. Modificado de (Logan et al., 1997).

1.2.4 Los centros señalizadores interactúan durante el desarrollo

Para que la extremidad se desarrolle adecuadamente se debe llevar a cabo un correcto establecimiento de patrones de las células que componen el primordio de la extremidad en los tres ejes anatómicos. La organización tridimensional de los tejidos en la extremidad está dada por las interacciones entre las señales del ectodermo dorsal, los FGF de la AER, y SHH de la ZPA (**Figura 5**).

En ratones mutantes que reflejan una pérdida de función en WNT7A, los dígitos posteriores se pierden con frecuencia, sugiriendo que WNT7A también es requerido para un

desarrollo normal en el eje A-P; además que la expresión de *Shh* en la ZPA se ve reducida en estos ratones (Gavin et al., 1990; Parr et al., 1993).

Por otro lado, se demostró la existencia de un loop de retroalimentación que involucra la señalización de FGF de la AER con SHH de la ZPA, coordinando así el desarrollo de la extremidad en el eje A-P y el eje P-D. La AER mantiene la expresión de *Shh* en la ZPA (Martin, 1998), mientras que SHH mantiene la expresión de los genes *Fgf* en la AER (Niswander et al., 1994). En embriones de ratón con una delección del gen *Shh*, las regiones distales de las extremidades se reducen considerablemente. Esto se podría deber al fallo de no poder mantener dicho loop de retroalimentación. Este loop también involucra un factor de crecimiento de las BMP, específicamente BMP4 que se encuentra expresado en el mesénquima del primordio (Pizette & Niswander, 1999).

En el primordio temprano de la extremidad, BMP4 induce la expresión de su antagonista *Gremlin1* (*Grem1*), aumentando los niveles de FGF de la AER; y de manera independiente se induce la expresión de *Shh* en la ZPA (**Figura 5A**). Posteriormente, la expresión de *Shh* aumenta y mantiene la expresión de *Grem1* y los niveles de BMP4 disminuyen, resultando en la formación del loop AER-ZPA antes descrito para dirigir el crecimiento P-D de la extremidad (Zeller et al., 2009) (**Figura 5B**) Dicho loop tarda aproximadamente 12 horas en ser completado (Bénazet et al., 2009). Por último, el ensanchamiento en la brecha en los patrones de expresión entre *Gremlin* y *Shh*, así como la actividad de algunos FGF de la AER, inhiben y disminuyen la expresión de *Grem1*, aumentando los niveles de BMP4, que posteriormente inhiben la expresión de *Fgf*, eliminando el loop AER-ZPA, y teniendo como resultado el término del crecimiento de la extremidad (Zeller et al., 2009) (**Figura 5C**) mas no de su desarrollo.

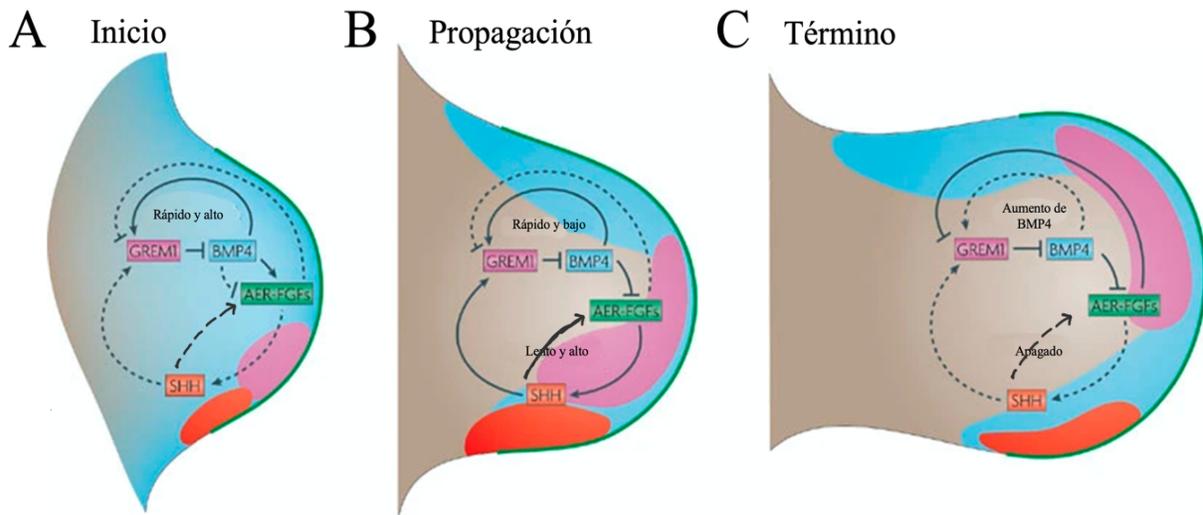
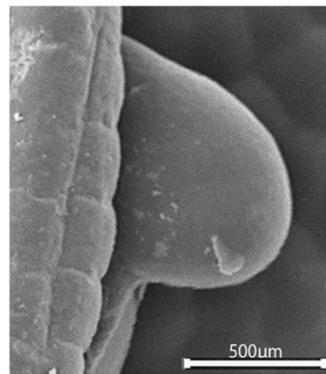


Figura 5. Integración entre los centros señalizadores en el primordio de la extremidad. (A) Fase de Inicio. BMP4 regula la expresión de *Grem1* con un loop iniciador de manera rápida. Se da la expresión de *Shh* de forma independiente a GREM1 y la AER. (B) En la fase de propagación se forma el loop de retroalimentación que dirige crecimiento distal durante el desarrollo. SHH aumenta la expresión de *Grem1*. GREM1 refuerza la señalización entre la AER-ZPA. (C) En la fase de término, se ensancha la brecha entre la señalización de SHH y el dominio de expresión de *Grem1* y se inhibe *Grem1* por los FGF de la AER. En consecuencia, la actividad de BMP4 se incrementa de nuevo. En (A, B y C) se muestran los dominios de expresión de *Bmp4* en azul, *Shh* en rojo, *Gremlin1* en morado, y de *Fgf* de la AER en verde. Las interacciones de los loops que operan en cada fase se muestran con líneas sólidas. Líneas punteadas muestran las interacciones inactivas. Modificado de (Zeller et al., 2009).

1.3 Diferenciación celular durante el desarrollo de la Extremidad

La extremidad de los tetrápodos se puede dividir en tres regiones anatómicas: 1) el estilópodo, que corresponde a la región proximal que tiene un elemento esquelético: el húmero en las extremidades anteriores o el fémur en las extremidades posteriores; 2) el zeugópodo en la región media que tiene dos elementos esqueléticos: radio/ulna en las extremidades anteriores o tibia/fíbula en las extremidades posteriores y, 3) el autópedo en la región distal, que desarrolla varios elementos esqueléticos segmentados de la mano (metacarpos, carpos, dedos), y del pie (metatarsos, tarsos y dedos) (**Figura 6**). Esta última región es la más variable entre especies.

Primordio de la Extremidad



Etapas Adultas

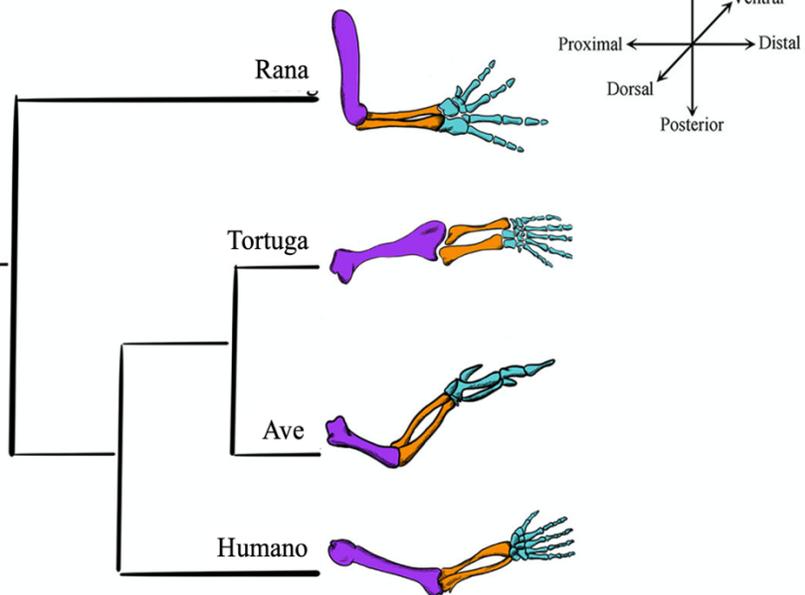


Figura 6. Las estructuras adultas de las extremidades se conservan en los tetrápodos. Se muestra una Microscopía Electrónica de Barrido de un primordio de la extremidad posterior de un embrión de pollo en etapa 22HH. Representaciones esquemáticas de las estructuras óseas adultas de varios vertebrados. El estilópodo, caracterizado por un elemento esquelético se muestra en morado; el zeugópodo, que tiene dos elementos esqueléticos de muestra en naranja, y el autópodo, con varios segmentos óseos segmentados, en azul. Tomado de (Marín-Llera et al., 2019).

Como se comentó en secciones pasadas, las células mesenquimales del primordio de la extremidad son mantenidas en estado indiferenciado y proliferativo bajo la influencia de la AER en la ZP (Fallon et al., 1994; Wolpert, 2002). Cuando las células de la ZP son desplazadas proximalmente y se alejan de la influencia de la AER y de los factores secretados por el ectodermo dorsal, se diferencian en varios tejidos incluyendo cartílago, músculo y tendones.

1.3.1 Condrogénesis

Los elementos esqueléticos de las extremidades se forman a partir de agregados de células conocidos como condensaciones mesenquimales. Estas condensaciones se median por cambios en la Matriz Extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), moléculas de adhesión celular, entre otras. El cartílago, que es un tipo de tejido conjuntivo especializado que no posee vasos sanguíneos, nervios, ni vasos linfáticos, se diferencia a partir de estas condensaciones, dando lugar a los primordios esqueléticos. Posteriormente, los condrocitos

en este primordio cartilaginoso, pasan a través de una serie de etapas que incluyen expansión, maduración e hipertrofia (Goldring et al., 2006; Karsenty & Wagner, 2002). Una vez maduro, el cartílago hipertrófico degenera, se calcifica y, tras ser invadido por vasos, es reemplazado por hueso primario, en un proceso llamado osificación endocondral (**Figura 7**).

En las etapas pre-condensación, los progenitores condrogénicos se especifican al expresar factores de transcripción como *Sox9* y *Scleraxis* (Lorda-Diez et al., 2011). Posteriormente, la etapa de condensación se caracteriza por la expresión de varias moléculas que resulta en la formación de un primordio cartilaginoso que prefigura el futuro elemento esquelético. Durante este proceso, las células mesenquimales proliferan e incrementan la expresión de proteínas de adhesión celular, remodelan moléculas de la ECM características de cada etapa, y reclutan células mesenquimales adyacentes, creando así un ambiente que favorece la condensación de los progenitores condrogénicos y su diferenciación hacia condrocitos (DeLise et al., 2000; Goldring et al., 2006; Hall & Miyake, 2000).

Durante la regulación en la formación de las condensaciones mesenquimales se han detectado varias moléculas como las proteínas involucradas en interacciones célula-célula y célula-ECM, N-CAM y N-CADHERINA que aumentan su expresión de manera transitoria (Tavella et al., 1994). Bloquear la función de estas moléculas previene la agregación y la formación del cartílago (Chuong et al., 1993). En cambio, su activación aumenta la expresión de *Sox9*, *Sox5*, *L-Sox5*, *Agrecano*, y *Colágena tipo II (Col2a1)* que son genes que se expresan durante el proceso condrogénico.

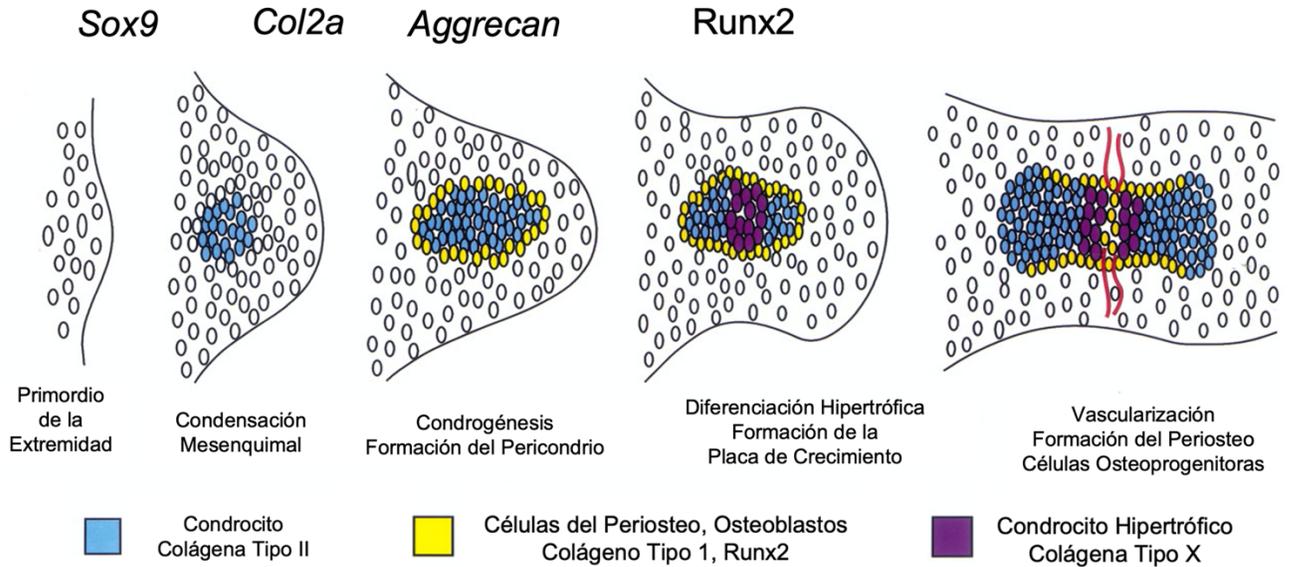


Figura 7. Etapas de la Condrogénesis y representación de la formación de un hueso por osificación endocondral. En la primera fase las células mesenquimales del primordio de la extremidad se encuentran en una etapa de precondensación, y hay una expresión al alta de *Sox9*; haciendo que esas células adquieran un compromiso celular a linaje condrogénico (Lorda-Diez et al., 2011). Después, las células condroprogenitoras se condensan para diferenciarse a condrocitos. En esta etapa, los condrocitos expresan *Col2a* (Azul) y *Aggrecan*. Por otro lado, las células osteoprogenitoras, caracterizadas por la expresión de *Runx2*, se localizan en la periferia de las condensaciones para formar el periostio. Posteriormente, los condrocitos hipertróficos entran a fase apoptótica, y son reemplazados por células osteoprogenitoras que se diferencian a osteoblastos caracterizados por la expresión de *Runx2* y *ColX* (morado). Imagen modificada de (Ornitz & Marie, 2002).

Las proteínas BMP, que también pertenecen a la superfamilia de TGF β se requieren tanto para la determinación de las células condroprogenitoras, como para la formación de las condensaciones precartilaginosas y su posterior diferenciación a condrocitos mediante la regulación de la expresión en *Sox9* (Pizette & Niswander, 2000). Ratones dobles mutantes a *Bmp2* y *Bmp4* muestran malformaciones en el esqueleto del estilópodo y zeugópodo, y una reducción de tamaño en el autópedo (Bandyopadhyay et al., 2006). Ratones dobles mutantes al gen *Bmpr1a/b* (receptor de BMP) no presentan condensaciones mesenquimales y hay una reducción en la expresión de *Sox9*, *Sox5* y *Sox 6* (Yoon et al., 2005). Por otro lado, se ha visto que la aplicación de perlas embebidas con los factores BMP en el mesénquima precondrogénico se exagera la formación del cartílago (Gañan et al., 1996), y aplicación de esas mismas perlas en la creciente digital, promueve la expansión del cartílago en las puntas de los dedos (Merino et al., 1999).

También, miembros de la superfamilia de los TGF β promueven eventos tempranos de la condrogénesis. En experimentos de ganancia de función, la aplicación de los factores TGF β -1, TGF β -2 y Activina en la zona interdigital de los primordios pueden inducir una formación de dígitos extras (dedos ectópicos) durante el desarrollo (Gañan et al., 1996) promoviendo así la expresión de *Sox9* (Chimal-Monroy et al., 2003; Montero et al., 2008).

Por último, las proteínas WNT, tanto las que señalizan por la vía canónica como las que usan la vía no canónica, están implicadas en las fases iniciales de la condrogénesis. Se encontró que durante el proceso de diferenciación de las células mesenquimales progenitoras hacia el linaje condrogénico por un tratamiento de TGF β 1, se activa la señalización de WNT7A (Tuli et al., 2003). También, se encontró que WNT5A y WNT5B promueven la condensación mesenquimal; en cambio, WNT4 bloquea el inicio de la condrogénesis, pero acelera la diferenciación de los condrocitos *in vitro* (Church et al., 2002).

En las condensaciones mesenquimales, el gen más temprano que se expresa durante la diferenciación condrogénica es *Sox9*. Gracias al modelo experimental sobre la inducción de un dedo ectópico por el factor TGF β , se pudo elucidar la cascada molecular temprana que lleva a la formación del cartílago *in vivo* (Chimal-Monroy et al., 2003). Aquí se muestra que *Sox9* es detectable a los 30 minutos después del tratamiento. La expresión de *Sox9* está regulada por proteínas FGF, BMP y WNT (Kawakami et al., 2006). Además, SOX9 regula directamente la expresión de genes que codifican proteínas mayoritarias en la ECM del cartílago, como *Agrecano* y *Col2a*, y proteoglicanos sulfatados; y es requerido para la expresión de genes que codifican proteínas minoritarias, incluyendo las *Colágenas tipo IX y XI* (V Lefebvre et al., 1997), siendo este gen el responsable de desencadenar los cambios en la ECM durante el desarrollo del cartílago.

Ratones knockout para *Sox9*, presentan una pérdida total de las condensaciones, lo que conduce a la formación de miembros muy cortos y sin elementos esqueléticos por una inhibición en la formación del cartílago (Akiyama et al., 2002), mostrando así que *Sox9* es indispensable para la condensación mesenquimal y la diferenciación de los condrocitos.

Además, las funciones de *Sox9* son incrementadas por *L-Sox5* y *Sox6*, los cuales se coexpresan con *Sox9* en las etapas tempranas del cartílago en desarrollo y actúan como correguladores en la activación de otros genes (Lefebvre, 2019).

En conjunto, se sabe que la expresión de *Sox9* en células mesenquimales media la determinación hacia el linaje condrogénico promoviendo la condensación mesenquimal y aumentando la expresión factores de transcripción y componentes de la ECM específicas de cartílago. Sin embargo, se ha demostrado que las células en las condensaciones mesenquimales expresan a la par de *Sox9* el marcador de progenitores osteogénicos *Runx2*, mostrando que las condensaciones en el primordio de la extremidad muestran un carácter bipotencial para diferenciarse tanto a linajes condrogénico como osteogénico (Akiyama et al., 2005; Marín-Llera et al., 2019). La inactivación de *Sox9* en las células mesenquimales derivadas de la cresta neural tiene como consecuencia la ausencia de cartílago y huesos endocondrales, y también lleva a una expresión ectópica de genes osteogénicos como *Runx2* y *Osterix* (Mori-Akiyama et al., 2003). Experimentos en embriones de pollo mostraron que SOX9 induce la formación de condroblastos en presencia de niveles bajos de RUNX2, mientras que RUNX2 promueve la diferenciación de osteoblastos si los niveles de SOX9 son bajos. Sin embargo, también existe un fenotipo intermedio con la expresión igualitaria de *Sox9* y *Runx2* que resulta en la formación de condroblastos de reemplazamiento (prehipertrofos) (Eames et al., 2004). Estos resultados demuestran que el balance SOX9-RUNX2 es un elemento clave en la determinación del tipo celular al que se diferenciarán las células osteocondroprogenitoras.

1.3.2 Hipertrofia y Osificación Endocondral

Una vez que el cartílago se ha formado, el proceso de la osificación endoncondral inicia con la migración de un grupo de células, primero al centro de los moldes de cartílago y después a los extremos para establecer los centros de osificación primario y secundario respectivamente (Mackie et al., 2008). Los condrocitos que participan en la osificación endoncondral se organizan en diferentes zonas que reflejan cambios en la función de estas células. En los extremos de los elementos esqueléticos, los condrocitos se diferencian en cartílago articular permanente, dando lugar a la zona I con células de morfología redondeada

y una tasa de proliferación lenta. De manera subsecuente, se encuentran los condrocitos de la zona II que exhiben una morfología aplanada y se organizan en columnas paralelas; y por último, al centro de los elementos esqueléticos, condrocitos proliferantes entran a un proceso de diferenciación hacia condrocitos hipertróficos dando lugar a la Zona Hipertrófica (Marín-Llera et al., 2019)(Figura 8).

En la zona I y II existen señales que mantienen a los condrocitos en un estado proliferativo cuando éstos siguen expresando *Sox9*. A su vez, estas células, junto con SOX5 y SOX6 siguen regulando la expresión de genes de la ECM como *colágenas tipo II, IX Y XI* y proteoglicanos, como el *Agregano* (Bi et al., 1999). Por otro lado, las células de la zona hipertrófica, incrementan su volumen de forma considerable, al mismo tiempo que secretan ECM que se mineraliza. Los condrocitos hipertróficos después mueren, y los huecos rodeados por la ECM son invadidos por células osteoprogenitoras y células que favorecen la vascularización (Bluteau et al., 2007). Los osteoprogenitores remueven la matriz del cartílago y se diferencian a osteoblastos que usan los remanentes de tejido como andamio para depositar la matriz de hueso formada principalmente por Colágena Tipo I (Mackie et al., 2008). También se ha propuesto que, en vez de una muerte celular, algunos de los condrocitos hipertróficos podrían sufrir un proceso de desdiferenciación y una rediferenciación hacia osteoblastos (Shapiro et al., 2005).

Cuando ocurre la transición de los condrocitos proliferativos a condrocitos hipertróficos, dos moléculas señalizadoras, la proteína relacionada a tiroides (PTHrP) e Indian Hedgehog (IHH), interaccionan en un loop de retroalimentación, y juegan un papel importante en la maduración de los condrocitos. Mutantes de ambas moléculas reducen la proliferación y maduración de los condrocitos, y un fallo en el desarrollo de osteoblastos (St-Jacques et al., 1999). La señalización por IHH promueve la expresión de *PTHrP*, que estimula la proliferación de los condrocitos e impide que se conviertan en condrocitos hipertróficos. Cuando los condrocitos proliferantes están suficientemente lejos de la fuente de PTHrP, las células detienen su proliferación y se establece el sitio donde los condrocitos se diferencian a cartílago hipertrófico donde inician la expresión de *Colágena tipo X*, característico de cartílago hipertrófico (Deng et al., 2018).

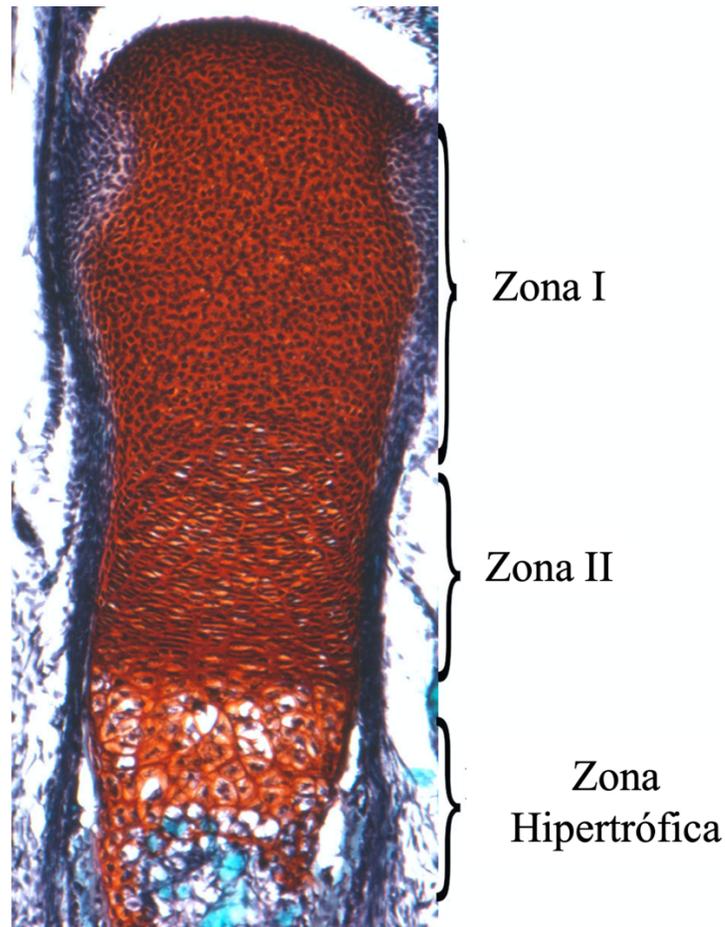


Figura 8. Osificación endocondral. Corte longitudinal de una tibia de un embrión de ratón etapa E18.5 teñido con Safranina O. La zona I corresponde a la epífisis completa y contiene condrocitos diferenciados que en esta etapa son proliferativos y originan el cartílago articular. La zona II corresponde a las células originadas de la Zona I, organizadas en columnas paralelas. Modificado de (Marín-Llera et al., 2019).

Como se mencionó en bloques pasados, la diferenciación osteogénica depende de la expresión de *Runx2*. La expresión de este gen aumenta la diferenciación de los condrocitos hipertrofos. Ratones knockout para *Runx2* presentan una falta de osificación (tanto endocondrial como intramembranosa), y su esqueleto permanece en estado cartilaginoso debido a la detención en la maduración de los osteoblastos y el fallo en la hipertrofia de los condrocitos (Inada et al., 1999). Una expresión de *Runx2* ectópica en el mesénquima de la cabeza del embrión de pollo conduce a un exceso de la formación de hueso (Eames et al.,

2004) y también, inhibe la función de SOX9 que trae como consecuencia, la disminución en la expresión de *Col2a1* y *Agreca* (G. et al., 2006).

1.3.3 Miogénesis

Las células progenitoras que originan el músculo en la extremidad tienen un origen diferente a los progenitores de los tejidos conjuntivos. Trabajos mostraron que, si se transplantan somitas de codorniz a un embrión de pollo del lado opuesto donde se desarrollaría el primordio del ala, el ala que se forma tendrá células musculares provenientes de codorniz, y todo el tejido conectivo será de pollo (Robson et al., 1994). Por lo tanto, las células progenitoras de músculo provienen de las somitas.

Las células progenitoras de músculo se comprometen en las somitas por la acción de los factores de transcripción PAX3 y PAX7. Posteriormente, migran al primordio en etapas tempranas del desarrollo (Jacob et al., 1978). Después de la migración, se forman los mioblastos que proliferan y se fusionan en segmentos de músculo presuntivo en los extremos dorsales y ventrales del primordio. Estos bloques llevan a cabo una serie de divisiones para dar origen a las células musculares individuales. La migración inicial de los mioblastos al primordio está restringido a las zonas dorsales o ventrales ya que las células no cruzan el límite dorsal-ventral del primordio, que es caracterizado por la expresión dorsal del factor de transcripción *Lmx1b* (Schweizer et al., 2004).

Las mismas células progenitoras de músculo pueden ser aisladas de los embriones de pollo y crecer en cultivo donde continúan su proliferación. Una vez que se remueven del medio los factores de crecimiento del medio, la proliferación de los mioblastos cesa e inicia su diferenciación a células musculares. *In vivo*, cuando la expresión de *Pax3* en los mioblastos disminuye, se detiene la proliferación y las células se diferencian. Señales del ectodermo adyacente (dorsal y ventral), incluyendo BMP4, previenen la diferenciación prematura hacia ese linaje (Amthor et al., 1998). Durante el proceso de diferenciación los mioblastos sufren cambios morfológicos: primero modifican la composición microtubular del citoesqueleto, y después se fusionan unas con otras para formar miotubos multinucleados.

Por último, las células empiezan a sintetizar proteínas específicas del músculo como Actina, Miosina II, y Tropomiosina (Taylor, 2003).

Factores de transcripción de la familia *MyoD* también son expresados en los mioblastos. Las proteínas de esta familia son claves en el desarrollo miogénico ya que prenden genes específicos de músculo y llevan a cabo su diferenciación. La familia incluye a los genes *MyoD*, *mrf4*, *myf5*, y *Myog*. *Mrf4*, *Myf5* y *MyoD* son los primeros genes en expresarse en los precursores musculares de los mamíferos y determinan las células a linaje miogénico (Rossi & Messina, 2014). Fibroblastos que normalmente no expresan *MyoD*, pueden diferenciarse a células musculares si se les introduce el gen; por lo tanto, se considera a *MyoD* como el gen regulador maestro para desarrollo muscular (Weintraub et al., 1989). Una vez prendidos, estos factores mantienen su expresión por un loop de retroalimentación positiva. Las proteínas MRF4, MYF5 y MYOD pueden activar el gen *Myog*, que está involucrado en la diferenciación estructural y la maduración funcional. *Mrf4*, *Myf5*, y *MyoD* están expresados en células proliferantes, e indiferenciadas, mientras que *Myog* está sólo expresado en células diferenciadas, no proliferantes. *Mrf4* también tiene un efecto secundario en la maduración de las fibras musculares (Smith et al., 1977).

A pesar de la demostración en la determinación celular por *MyoD*, ratones knock-out para dicho gen muestran un desarrollo normal aparente del músculo esquelético, siempre y cuando MYF5 esté activo. Pero, ratones dobles mutantes *Myf5* y *MyoD* mueren antes del nacimiento, pero esos embriones que aún expresan *Mrf4*, desarrollan algo de músculo (Rudnicki et al., 1993). Estos últimos ensayos sugieren que hay una redundancia entre los integrantes de la familia MyoD, ya que entre ellos pueden compensar la ausencia de uno de sus componentes. En contraste, en ratones donde el gen *Myog* es eliminado, la mayoría del músculo esquelético está ausente. Por lo tanto, Miogenina es considerada un factor de diferenciación más que una proteína esencial para la determinación muscular (Arnold & Braun, 1996)

1.3.4 Tenogénesis

Los tendones son tejidos conjuntivos altamente organizados que transmiten las fuerzas mecánicas del músculo al hueso, por lo que tienen dos puntos de inserción, uno con los músculos y otro en los huesos. El punto de unión con el músculo se denomina unión miotendinosa, y la unión con el hueso se llama unión osteotendinosa. El tendón es un tejido conectivo denso y regular, consistente de colágenas, principalmente Colágena Tipo I, y células mesenquimales especializadas conocidas como tenocitos, que son los responsables de la síntesis y secreción de la ECM específica de tendones, así como del mantenimiento de la estructura de los colágenas. La arquitectura de los tendones es variable y se da por la combinación de los distintos tipos de colágena, con los componentes de la ECM. Dichas diferencias entre las combinaciones derivan en las diversas propiedades mecánicas que pueden tener los tendones (Zhang et al., 2005).

En el pollo, los tenocitos se empiezan a diferenciar al día 5 de desarrollo sintetizando su ECM (Ros et al., 1995). Cabe resaltar que ninguno de los componentes de la ECM es específico para tendones, por lo que no sirven de marcadores para identificar a las células progenitoras de tendón. Sin embargo, se encontró que el factor de transcripción Scleraxis (SCX) marca de forma general a los tendones durante su desarrollo, por lo que también marque a los progenitores tenogénicos (Schweitzer et al., 2001). Sin embargo, también es de notar que *Scx* se encuentra expresado en ligamentos. Scleraxis a su vez regula la expresión del gen *Tenomodulina (Tnmd)*, otro marcador de diferenciación tendinosa, pero en etapas tardías (Shukunami et al., 2006). Los transcritos de *Scx* son detectados en la etapa 19HH de un embrión de pollo y son localizados en las zonas dorsales y ventrales del primordio de la extremidad (Schweitzer et al., 2001) (**Figura 9B**). Remoción del ectodermo dorsal de la extremidad en estas etapas conduce a la inhibición de la expresión dorsal de *Scx*, lo que sugiere un papel del ectodermo en su regulación (Edom-Vovard & Duprez, 2004).

Otro gen cuya expresión es crítica para la diferenciación de los tendones es *Mohawk (Mkx)*. Ratones knock-out para este gen, muestran una baja en la densidad celular de los tendones, y una disminución en la expresión y cantidad de colágenas, específicamente *colágena tipo I* (Ito et al., 2010). Se tiene que recalcar que los fenotipos de los ratones knock-

out para *Scx* y *Mkx* son diferentes. Mientras que los mutantes en *Scx* producen una pérdida completa de segmentos en los tendones, ratones con deleciones en *Mkx* sólo presentan una reducción en la densidad del tendón. Estos datos sugieren que *Scx* es esencial para el inicio de la diferenciación tenogénica y *Mkx* participa en la maduración del tendón (Anderson et al., 2006)

1.3.5 El desarrollo de los músculos y tendones de la extremidad están relacionados

Se ha descrito que las células precursoras de los tendones provienen de la LPM, mientras que los precursores miogénicos migran al primordio de la extremidad desde las somitas. Ambos grupos de células progenitoras se localizan en las zonas dorsales y ventrales del primordio (**Figura 9**) por lo que la morfogénesis del músculo y los tendones ocurre en un espacio y tiempo muy asociados (Kardon, 1998). Ablaciones del ectodermo dorsal del primordio conduce a la inhibición de *Scx* y también a la desaparición de marcadores para progenitores musculares y una disminución en la proliferación celular (Amthor et al., 1998).

Se sabe que miembros de la familia BMP están involucrados en regular a la baja la expresión de *Scx*; de manera contraria, aplicación de antagonistas de BMP como Noggina, extienden la expresión de *Scx* en el primordio temprano de la extremidad (Schweitzer et al., 2001). Las proteínas BMP también son reguladores negativos de los marcadores miogénicos en esta etapa de desarrollo (Amthor et al., 1998). La aplicación de una perla embebida con BMP en el lado dorsal del primordio, inhibe la expresión de *Pax3* y *MyoD*. Estos experimentos indican que tanto las células miogénicas como las células tenogénicas responden de manera similar a las señales del ectodermo que influyen en su posición y diferenciación en las regiones dorsales y ventrales de las extremidades.

En ratones dobles knock-out para *Pax3* y *MyoD*, se da la expresión temprana de *Scx* de forma normal, y se desarrollan tendones en alas sin músculo (Schweitzer et al., 2001). Que la expresión de *Scx* ocurra normalmente en ausencia de células musculares, indica que, en etapas tempranas, el proceso tenogénico es independiente al proceso miogénico, por lo que las células musculares no interaccionan con las células de tendones en estas etapas.

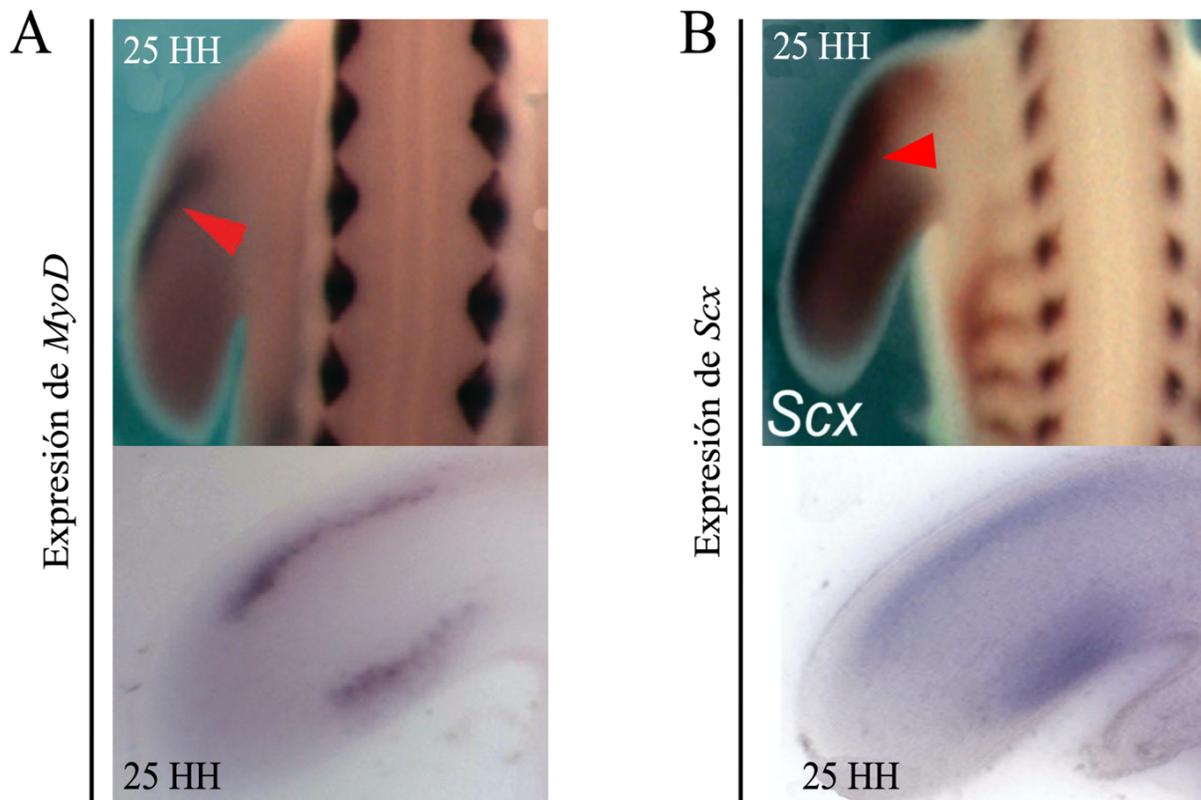


Figura 9. Genes maestro de diferenciación miogénica y tenogénica. (A) Hibridación in situ de *MyoD*. (B) Hibridación in situ de *Scleraxis*. En ambos casos se muestran la expresión de los genes en primordios de las extremidades anteriores de embriones de pollo etapa 25HH. En la parte superior se encuentra la expresión Whole Mount marcando con flechas rojas la expresión correspondiente a los primordios. En la parte inferior se encuentran secciones transversales cortados en vibratomo, demostrando que las expresiones de ambos genes se encuentran en el mesénquima del primordio restringidos a los márgenes dorsales y ventrales. Modificado de (Reijntjes et al., 2010).

Posteriormente, la expresión de *Scx* se segrega de las células miogénicas. Esta fase corresponde a los numerosos rearrreglos espaciales que tienen las masas musculares y los primordios de tendones, resultando en una separación progresiva para formar músculos y tendones individuales (Kardon, 1998). En esta etapa se propone que las células de tendón contribuyen a la regionalización del músculo durante el desarrollo (Chevallier & Kieny, 1982). Las células musculares también influyen en la distribución de la expresión de *Scx* y *Tenascina*, otro marcador específico de tendones (Kardon, 1998). Sin embargo, el grado de dependencia varía a lo largo del eje P-D de la extremidad, ya que los músculos son requeridos para la segregación de los tendones del estilópodo y zeugópodo, pero no del autópedo

(Kardon, 1998), donde los primordios de los tendones se asocian más al desarrollo del cartílago de los dígitos (Hurle et al., 1990).

En las últimas fases, la expresión de *Scx* corresponde a las etapas donde se establece todo el patrón de tendones y músculos. Aquí, la expresión de *Scx* es músculo-dependiente, ya que en ausencia de músculos, la expresión de *Scx* baja gradualmente desde las zonas proximales a las distales de la extremidad, al igual que *Tenascina* (Kardon, 1998). Aplicación ectópica de FGF4 en dichas extremidades sin músculo, rescata la expresión de *Scleraxis* y *Tenascina* (Edom-Vovard et al., 2002). *Fgf4* se expresa en los miotubos, y se localiza preferencialmente alrededor del núcleo cerca de los extremos de las células musculares multinucleadas. La localización preferencial de los transcritos de *Fgf4* en las células musculares, cerca de los tendones, indica que juega un papel importante en la fase músculo-dependiente de la expresión de *Scleraxis*. El efecto proliferativo de FGF4 en las células de tendones es consistente con estudios *in vitro* donde FGF incrementa la proliferación de fibroblastos derivados de varios tendones (Chan et al., 1997). Otro elemento de la misma familia, FGF8 se encuentra expresado en los tendones al final del desarrollo de la extremidad (Edom-Vovard et al., 2001); sin embargo, la expresión ectópica del FGF8, no muestra un efecto dramático en la expresión de *Scx*, por lo que aún se desconoce su papel.

Las extremidades son estructuras complejas que presentan en ellas diversos tejidos con una ubicación espacial bien definida. Las extremidades provienen de un primordio que contiene células mesenquimales inicialmente indiferenciadas que, al responder a diversas señales del ectodermo y ellas mismas, adquieren el compromiso a un linaje celular y de organización tridimensional durante el desarrollo embrionario.

2. EXTREMIDADES RECOMBINANTES

El avance en el estudio de la diferenciación celular y el establecimiento de patrones durante el desarrollo de la extremidad, se ha logrado por el uso de varias aproximaciones metodológicas, siendo una de ellas las extremidades recombinantes. Una extremidad recombinante (ER) es una estructura parecida a la extremidad creada por el ensamblaje del mesodermo del primordio dentro de un capuchón de ectodermo. Cuando la ER se transplanta a un sitio apropiado, como las somitas o el primordio de la extremidad de un embrión hospedero, la extremidad recombinante forma una estructura similar a la extremidad normal.

Este procedimiento fue descrito por Edgar Zwillig (Zwillig, 1956), quien utilizó este método experimental para estudiar las interacciones entre el ectodermo y el mesodermo del primordio. Ya que el mesénquima de las aves es accesible, la mayoría de las ER se han hecho y descrito usando componentes de embriones de pollo. Sin embargo, extremidades recombinantes con otras especies, como *Xenopus*, han sido obtenidas con efectividad (Yokoyama et al., 1998, 2002).

Cuando se construyen las ER, las posibilidades de recombinación son muchas, ya que las condiciones tanto del mesodermo como del ectodermo pueden variar. Se pueden realizar ER con componentes de primordios en distintas etapas, con diferentes segmentos anteriores o posteriores de los primordios, o con células que tiene algún tratamiento previo con factores de transcripción o agonistas/antagonistas de ciertas vías de señalización.

La variabilidad de la técnica ha permitido estudiar diferentes procesos del desarrollo de las extremidades, como la acción de la ZPA en el primordio (Frederick & Fallon, 1982), estudios sobre diferenciación de mioblastos (Marian Fernandez-Teran et al., 1999), la regulación de diversos genes *Hox* en el establecimiento del eje P-D de la extremidad (Fallon et al., 1994), e incluso eventos celulares durante la regeneración de la extremidad de *Xenopus* (Yokoyama et al., 2002).

Según los componentes mesodérmicos utilizados, proponemos que las ER se pueden dividir en 4 categorías. Las primeras dos, usan las células mesenquimales propias del

primordio de la extremidad, ya sea intactas (**Figura 10-1**), o que pasaron por un proceso de disociación y re-agregación (**Figura 10-2**). La tercera y cuarta categoría usan células distintas a las células mesenquimales del primordio para rellenar. Por ejemplo, se han descrito ER con células de mesodermo presuntivo de la extremidad (usando embriones cuyo campo de la extremidad no se ha determinado) (**Figura 10-3**), o incluso con células troncales/progenitoras presuntivas que puedan responder a las señales embrionarias de diferenciación del primordio de la extremidad (**Figura 10-4**).

De este modo, la ER es un sistema autónomo que recapitula *in vivo* los procesos de diferenciación y formación de patrones que ocurren durante el desarrollo de la extremidad. En ésta se mantienen las señalizaciones del ectodermo dorsal y ventral, así como de la AER; y cuando se usan células mesenquimales propias del primordio de la extremidad, se induce la expresión de *Shh*, y forma la ZPA (Frederick & Fallon, 1982). De este modo, las células que se encuentran bajo la influencia de los 3 centros señalizadores son inducidas a expresar genes que determinan el eje P-D como *Meis1*, *Hoxa11*, *Hoxa13*; y de diferenciación celular a diversos linajes como *Sox9*, que terminan evidenciando la formación de elementos esqueléticos dentro del sistema (Roselló-Díez et al., 2011; Cooper et al., 2011).

Gracias a la versatilidad y utilidad que ofrece la ER, es razonable pensar que esta técnica ofrece la posibilidad de usar diferentes células a las del primordio de la extremidad para estudiar su capacidad de diferenciación y morfogenética de manera tridimensional.

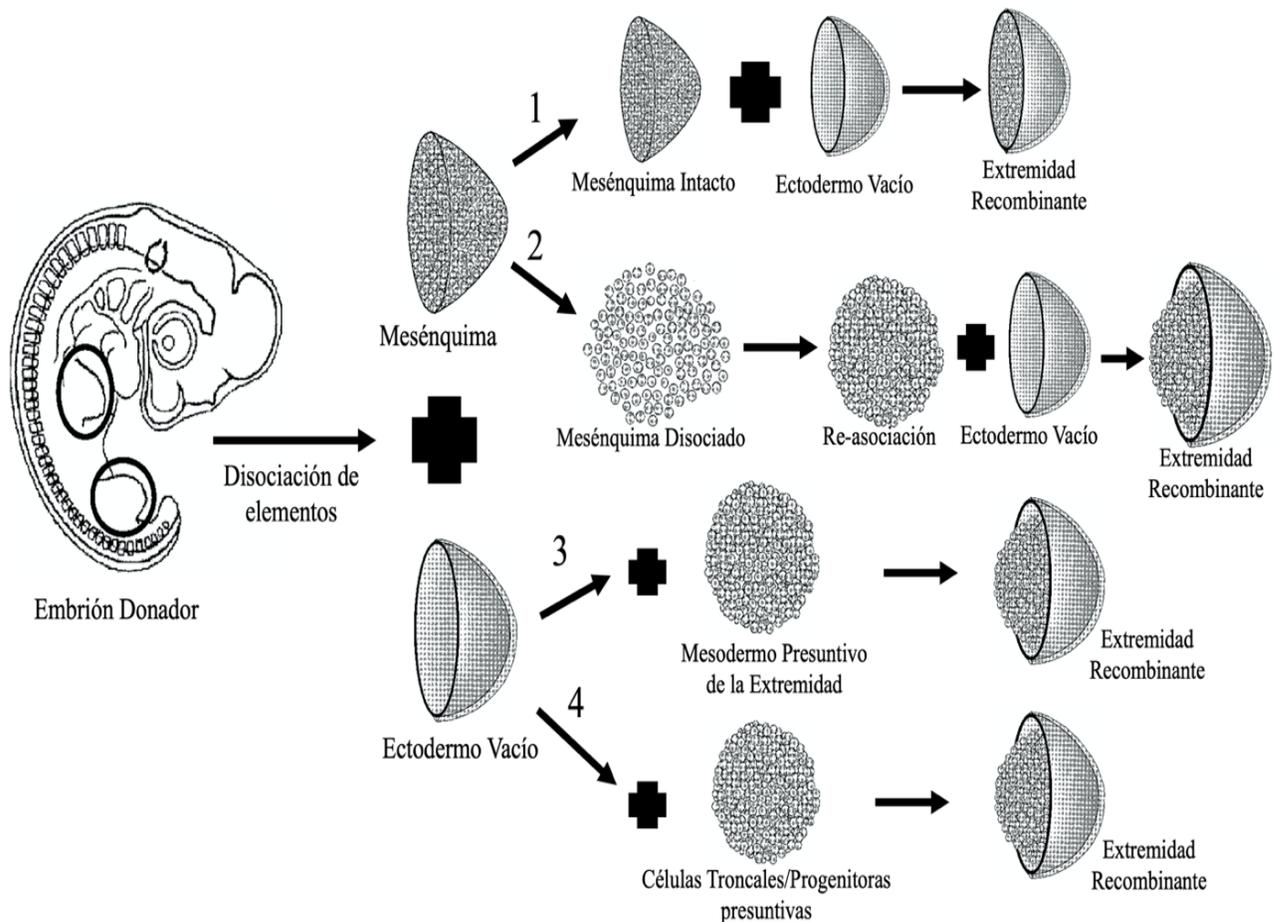


Figura 10. Extremidades Recombinantes. La técnica de Extremidades Recombinantes consiste en aislar los primordios de las extremidades de un embrión donador. Se les da un tratamiento enzimático para poder separar de manera mecánica el mesénquima del ectodermo. Se distinguen las 4 categorías con las cuales se pueden dividir las ER propuestas en nuestro laboratorio. Los esquemas para ilustrar las 4 categorías que se proponen fueron tomados y modificados de (Fernandez-Teran et al., 1999).

3. CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES

Cuando se trasplantan fragmentos de médula ósea en un sitio heterotópico, éstas dan lugar a la formación *de novo* de hueso, y si los mismos fragmentos se trasplantan en la cápsula renal, el nuevo hueso es colonizado por células hematopoyéticas (Friedenstein et al., 1966; Tavassoli & Crosby, 1968). Con estos experimentos se hipotetizó que las células de la médula ósea tenían un potencial osteogénico, o que podían producir factores que inducen la formación de hueso en células extra-esqueléticas. Las responsables de este fenómeno fueron descritas como células estromales de la médula ósea (BMSC, por sus siglas en inglés), y para

identificarlas se desarrollaron cultivos celulares. Suspensiones de médula ósea incluían células hematopoyéticas, y células del estroma no hematopoyético. Dada la incapacidad de las células hematopoyéticas de adherirse al plástico, el cultivo de células adherentes de dicha suspensión se convirtió en una forma de aislar a las BMSC (Friedenstein et al., 1970, 1974) cuando aún no existía la tecnología de la citometría de flujo. Con dichos cultivos se llegó a la caracterización de progenitores clonogénicos, que, al ser expandidos, generan una progenie clonal de células estromales trasplantables con potencial osteogénico (Bianco, 2014). Sin embargo, en dichos trasplantes, también se observó la formación de otros tejidos como cartílago, y adipocitos. Así, se hipotetizó la existencia de un progenitor común para múltiples tejidos esqueléticos en la médula ósea posnatal, y que podría ser un segundo tipo de célula troncal además de la célula troncal hematopoyética ya descrita.

Posteriormente, Caplan en 1991 introduce el término de “Célula Troncal Mesenquimal” (MSC, por sus siglas en inglés) para denotar a la misma población de progenitores estromales de la médula ósea que se diferencian a tejidos esqueléticos. En dicha terminología, expande la posibilidad de las células a diferenciarse no sólo a hueso, cartílago y tejido adiposo, sino también a músculo esquelético, tendones y ligamentos; donde todos los tejidos se forman por un proceso llamado “mesengénico” (Caplan, 1991). Así, las MSC fueron catalogadas como un progenitor posnatal común que lleva a cabo el proceso mesengénico *in vivo* para derivar en todos los tejidos esqueléticos, aunque esto no se ha demostrado experimentalmente. También, cabe destacar que una Célula Troncal se define por ser una célula indiferenciada con propiedades de autorrenovación por largos periodos de tiempo y además, con capacidad de diferenciación, por lo menos, hacia un linaje celular (Lajtha, 1979; Slack, 2008). Sin embargo, no se ha demostrado la capacidad de autorrenovación de las MSC, por lo que su nombre derivó a Células Mesenquimales Estromales, dejando el acrónimo “MSC” intacto.

Con el trabajo de Pittenger, se propone que los cultivos de BMSC antes descritos eran cultivos de MSC que se pueden expandir *in vitro*. Bajo esas mismas condiciones, las MSC pueden diferenciarse químicamente hacia distintos linajes incluyendo osteocitos, adipocitos y condrocitos; y que estos ensayos se pueden usar de manera independiente de los ensayos

in vivo (Pittenger et al., 1999). Posteriormente, también se demostró que las MSC tienen la capacidad de generar linajes celulares pertenecientes a las otras capas germinales *in vitro*, como el ectodermo (Kopen et al., 1999) y endodermo (Snykers et al., 2009).

Las MSC se han encontrado y aislado de diferentes fuentes: como tejidos adultos, tejidos embrionarios y extraembrionarios. Debido a que no se ha definido algún marcador para identificar a las MSC, la Sociedad Internacional de Terapia Celular describió varios criterios que deben cumplir las células para ser consideradas como MSC. Primero, deben ser células adherentes en cultivos *in vitro*. Segundo, deben ser positivas a los marcadores CD105, CD73, y CD90, además de expresar bajos niveles de HLA-I y ser negativas para HLA-II, CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31, los cuales son marcadores de linaje hematopoyético. Y como última característica, deben tener la capacidad de diferenciación a linajes mesenquimales entre ellos hueso, cartílago y tejido adiposo (Dominici et al., 2006).

3.1 MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical

En 1989 la Sangre de Cordón Umbilical (SCU) se propuso como una fuente alternativa de Células Troncales Hematopoyéticas (Gluckman, 1989). Ahora, se establece como una tercera fuente detrás de la obtención en la Médula Ósea, y de la sangre periférica movilizada (Broxmeyer, 2005). Usar SCU tiene ventajas como un procedimiento de obtención rápido y un número reducido de reacciones inmunológicas (Brunstein & Wagner, 2006).

Esquemáticamente, en la SCU se pueden distinguir 3 poblaciones troncales/progenitoras de células: 1) las Células Troncales Hematopoyéticas, 2) las células progenitoras de endotelio con expresión de CD133, CD34 Y VEGFR, y 3) las células progenitoras no hematopoyéticas (Bieback, et al., 2007). Posteriormente, a este último grupo se le caracterizó como las Células Mesenquimales Estromales Multipotentes provenientes de Sangre de Cordón Umbilical (MSC – SCU).

A pesar del hecho que las MSC se han encontrado en varios órganos, la presencia de MSC en la sangre circulante fue controversial y llegó ser tema de discusión por varios años (He et al., 2007; Mareschi et al., 2001; Wexler et al., 2003). Al final, diversos reportes

demonstraron que las MSC circulando en la sangre estaban en muy bajas frecuencias, lo cual dificultaba su aislamiento y expansión. Fue hasta el año 2000, donde el grupo de Erices y colaboradores aislaron un grupo de células adherentes con forma fibroblastoide derivadas de SCU, y demostraron que tenían una capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos. La frecuencia de estos precursores fue extremadamente baja, entre 0.05 a 3 MSC - SCU por cada millón de células mononucleadas (Erices et al., 2000; Goodwin et al., 2001), y su inmunofenotipo siendo común para todas las poblaciones de MSC de otros tejidos.

Las MSC – SCU también son capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo estímulos de diferenciación. Estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación osteogénica con β -glicerolfosfato y dexametasona induce la sobreexpresión de marcadores osteogénicos (Erices et al., 2000; Lee et al., 2004). Cuando se comparan los datos cuantitativos, las MSC – SCU muestran un mayor potencial de diferenciación *in vitro* hacia linaje osteogénico que las MSC de Médula Ósea. La diferenciación condrogénica, que se puede evaluar por ensayos de micromasas junto con inductores como TGF β o BMP, no tuvo diferencias con las MSC de Médula Ósea (Bieback, 2004; Lee et al., 2004). En caso contrario, la capacidad de diferenciación a linajes adipogénicos se vio disminuída en las MSC – SCU (Bieback, 2004). Una variedad de publicaciones dictan que las MSC – SCU no se restringen a linajes mesodérmicos, sino que se ha encontrado su capacidad de diferenciarse a células de linajes neuronales (Lee et al., 2004), hepatocitos (Tang et al., 2006), células endoteliales (Gang et al., 2006), mioblastos (Nunes et al., 2007), y células cardiomiogénicas (Kim et al., 2005).

Es de relevancia para este trabajo destacar que todos los estudios de diferenciación de las MSC – SCU se han realizado *in vitro* sobre cultivos celulares (bidimensionales). Debido a ésto, no ha sido posible estudiar las capacidades morfogenéticas ni de diferenciación de las MSC en un sistema *in vivo* ni tridimensional.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, se han usado las MSC cultivadas *in vitro* en diferentes estudios de terapia celular. Esto puede ser factible ya que estas células poseen propiedades biológicas que las hacen buenas candidatas: 1) Tienen un amplio potencial de diferenciación, 2) secretan factores tróficos que favorecen la remodelación tisular, 3) poseen baja inmunogenicidad, y 4) tienen propiedades inmunosupresoras (Montesinos et al., 2011). Debido a estas características, se ha propuesto que las MSC son potencialmente aplicables a numerosos padecimientos. Sin embargo, los estudios donde usan estas células como una terapia de medicina regenerativa no han generado avances conclusivos ya que aún no están claros los eventos moleculares que median dichas reparaciones por lo que, antes de usarlas en terapias celulares, es necesario comprender los mecanismos moleculares que controlan la especificación del destino de estas células hacia los distintos linajes a los que se pueden diferenciar.

Cabe resaltar, que a la fecha no hay trabajos reportados que describan la capacidad de organización tridimensional de estas células *per se*. Por lo anterior, es necesario evaluar la capacidad de diferenciación y morfogenética de las MSC, así como mecanismos moleculares de especificación en un modelo *in vivo*. Para ello, en este trabajo se propone estudiar la capacidad de diferenciación de las MSC, en específico de las MSC – SCU ante la exposición de señales embrionarias del desarrollo de la extremidad en un modelo *in vivo* como son las Extremidades Recombinantes, y estudiar si tienen la capacidad de organizarse y formar un elemento esquelético complejo.

VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las MSC provenientes de Sangre de Cordon Umbilical de Humano son capaces de organizarse en estructuras esqueléticas complejas al responder a señales embrionarias de diferenciación y morfogenéticas de la extremidad?

VII. HIPÓTESIS

Las MSC derivadas de sangre de cordón umbilical de humano responden a las señales provenientes del ectodermo embrionario de la extremidad, lo cual promueve su diferenciación hacia linajes condrogénicos, tenogénicos y/u osteogénicos. Además, tienen la capacidad de organizarse morfológicamente en estructuras esqueléticas complejas.

VIII. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la capacidad de diferenciación y morfogenética *in vivo* de las MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical.

ESPECÍFICOS

- Realizar Extremidades Recombinantes con MSC - SCU (ER - SCU) y observar su desarrollo.
- Determinar la organización morfológica y celular de las ER – SCU.
- Evaluar la integridad celular y molecular del ectodermo en las ER – SCU.
- Determinar la capacidad de diferenciación *in vivo* de las MSC - SCU en las Extremidades Recombinantes hacia los linajes celulares presentes en la extremidad
- Evaluar el patrón de expresión de genes involucrados en la diferenciación de los diferentes linajes de la extremidad

IX. DISEÑO EXPERIMENTAL

El abordaje experimental se realizó según el siguiente diseño

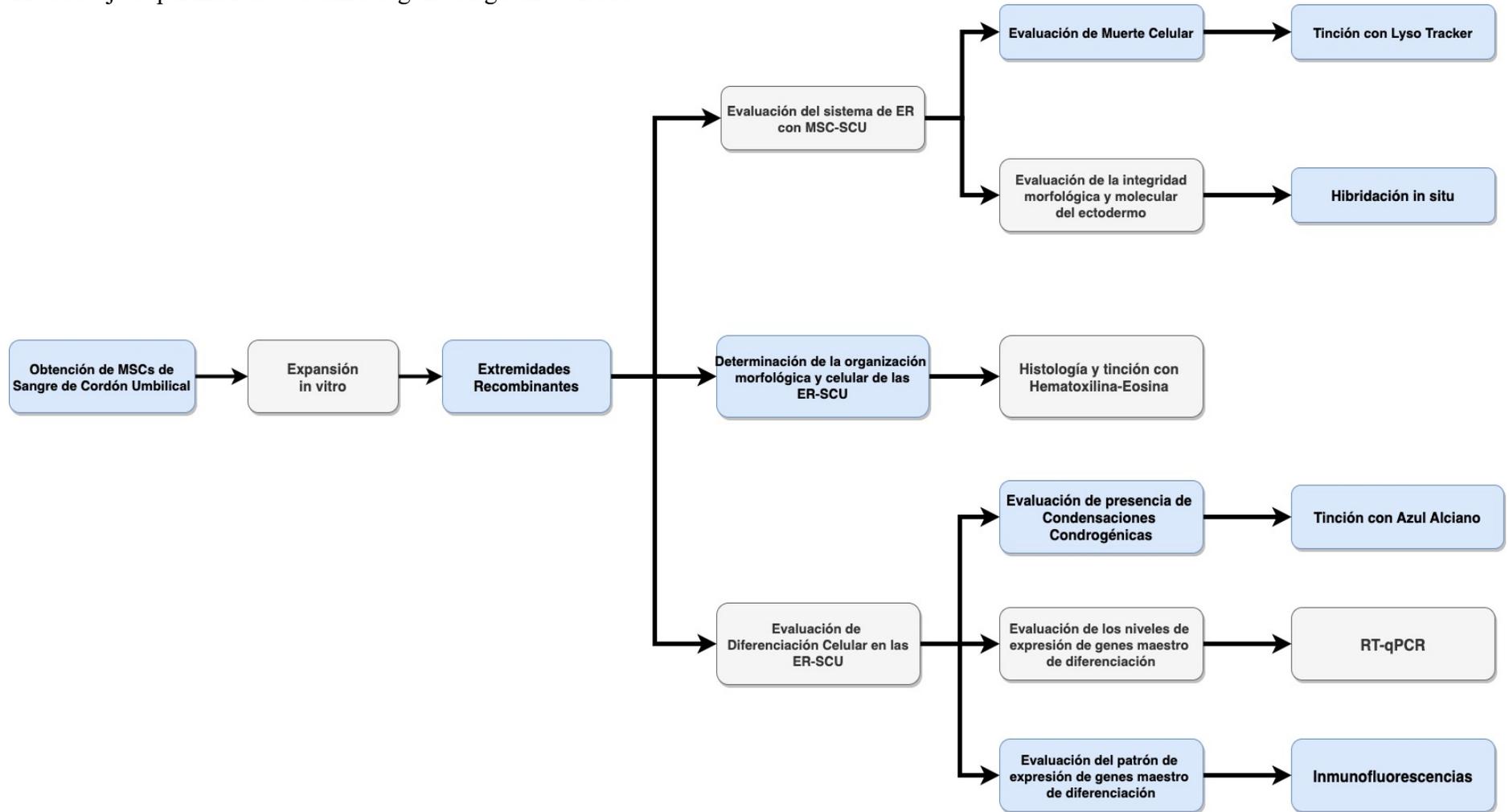


Figura 11. Diseño Experimental de este proyecto de investigación.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y cultivo de las MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical (MSC-SCU)

La obtención y expansión de las MSC – SCU lo realizó el grupo de trabajo del Dr. Juan José Montesinos Montesinos como parte de una colaboración. El laboratorio del Dr. Montesinos se encuentra en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI). Todas las muestras se obtuvieron de donadores sanos, bajo los estándares éticos del CMNSXXI. Las MSC de sangre de cordón umbilical se obtuvieron de partos a término o cesáreas. Una vez liberada la placenta con el cordón umbilical, se colectó la sangre en una bolsa de colección con anticoagulante. Se pinchó la vena umbilical con una aguja. Se aislaron las células mononucleares (CMN) por un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus. Se obtuvo la interfase de CMN y se lavó con PBS. El botón celular se resuspendió en 1 ml de medio DMEM con 8 μ l/ml de una combinación de 4 antibióticos (Ciprofloxacilina 100 mg/ml, 200 mg/100 ml; Gentamicina 20 mg/ml, 50 mg/ml; Vancomicina 200 mg y Eritromicina 200 mg). Las células se cultivaron en cajas de Petri de 100 mm a una concentración de 1×10^6 a 2×10^6 /cm² y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Cuatro días después se desechó el medio de cultivo con las células no adherentes, se lavaron 2 veces con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco. Se incubaron de nuevo y se observaron las células bajo un microscopio para determinar la presencia de MSC. Al tercer pase celular, se evaluó el inmunomarcaje característico de las MSC y las células se congelaron en un tanque de nitrógeno. Para las ER, las MSC se descongelaron y se utilizaron pases correspondientes del pase 4 al pase 7. Al expandir las células y llegar al pase correspondiente, se cosecharon y el pellet formado me fue entregado para realizar las Extremidades Recombinantes en el laboratorio del Dr. Jesús Chimal Monroy en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

2. Extremidades Recombinantes con MSC-SCU

Esta técnica consiste en rellenar un ectodermo de primordio de extremidad de un embrión de pollo donador con células, en este caso, de MSC-SCU e implantarlo *in ovo* en un embrión de

pollo receptor para permitir su desarrollo. Esta técnica consta de 4 pasos: a) obtención de células, b) obtención de ectodermos, c) relleno de ectodermos y d) trasplante de los ectodermos a un embrión receptor.

a. Obtención de células

Una vez que el cultivo celular de MSC, correspondientes del pase 2 al pase 5, alcanzó una confluencia del 90%, se lavó una vez con PBS y se añadió tripsina al 0.75X durante 6 minutos. Se añadió 1 ml de medio DMEM alto en glucosa y se centrifugaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml a 1,200 rpm durante 5 minutos. El pellet formado se dejó incubando a 37°C en un Thermoblock (Corning, D1100) por 1 hora.

b. Obtención de ectodermos

Se incubaron huevos fértiles con embriones de pollo hasta que llegaron a etapas 21HH – 22HH (según Hamburger & Hamilton, 1951), que corresponden a 4 días de incubación a 38°C con 55% de Humedad. Se realizó una ventana en el cascarón y se retiró la membrana aérea. Con unas pinzas curvas se extrajo el embrión en una caja Petri con PBS y se retiró el amnios. Se cortaron los primordios de las extremidades anteriores y posteriores y se recolectaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se trataron con 500 µl de tripsina (Sigma, 85450C) al 0.5% en PBS por 30 minutos a 37°C en el Thermoblock (Corning, D1100). Una vez finalizado el tiempo, los primordios se colocaron en una caja Petri, y se cambió la solución de la Tripsina por Suero Fetal Bovino (ATCC 30-2020) al 10% en PBS. Con un par de pinzas se separaron los ectodermos de cada primordio de forma mecánica, y el mesénquima restante se desechó.

c. Rellenado de Ectodermos

Una vez obtenidos los ectodermos vacíos, se tomó el pellet de MSC – SCU, y se pasó a la caja Petri donde se encontraban los ectodermos vacíos. Con ayuda de pinzas, se tomó un pedazo del pellet de células y se introdujo en uno de los ectodermos vacíos. Se repitió el procedimiento hasta tener todos los ectodermos rellenos. El pellet de MSC restantes que no se utilizó para rellenar los ectodermos se congelaron para ser usadas como control en los ensayos de qRT-PCR.

d. Trasplante

Como organismo receptor, se usaron embriones de pollos en etapas 21HH - 22HH. Con unas pinzas se realizó una ventana en el cascarón para exponer al embrión. Se retiró la membrana aérea, y se hizo un orificio en el amnios a la altura del primordio del ala *in ovo*. Con un

filamento de tungsteno se realizó una herida entre el primordio del ala y las somitas. Se tomó un ectodermo relleno del paso anterior y se posicionó sobre la herida recién hecha. El ectodermo relleno se sujetó al embrión con ayuda de un par de alambres de paladio (Goodfellow Corporation, 522-738-52). Por último, la ventana del cascarón se tapó con cinta adhesiva, y se dejó desarrollar por 24, 48 y 72 horas en una incubadora de huevo (Incumatic 1000) a 38°C y 55% de humedad. Las ER obtenidas se utilizaron para 1) tinción de esqueleto e histologías, 2) tinción con LysoTracker, 3) RT-qPCR, 4) Inmunofluorescencia y 5) Hibridación *in situ* de manera independiente.

3. Tinción de esqueleto en extremidades recombinantes (ER)

Para evidenciar la formación de cartílago en las ER-SCU se realizó la tinción con azul alciano. Pasado los tiempos indicados (24, 48 y 72 hrs) se sacaron los huevos de la incubadora y se retiró la cinta adhesiva. Con ayuda de unas pinzas curvas, se extrajeron los embriones a una caja Petri, y se lavaron una vez con PBS. Se separaron los troncos de los embriones donde se implantaron las ER y se fijaron con ácido tricloroacético (TCA; Sigma, T6399) al 5% por 24 hrs a 4°C. Se tiñeron por 24 hrs con azul alciano (Sigma, 335630) al 1% diluido en Alcohol Ácido (Etanol al 70% / HCl, en proporción 99:1). Se lavaron dos veces con Alcohol Ácido 30 min cada uno, y se deshidrataron 2 veces con etanol absoluto durante 1 hora cada uno. Por último, se aclararon con metilsalicilato (Sigma, M2047) por 24 horas. Las tinciones de Azul Alciano se fotografiaron en estereoscopio (Zeiss, Axio Zoom.V16) acoplado con una cámara (Zeiss, AxioCam 503).

4. Inclusión de muestras en parafina y cortes histológicos

Una vez fotografiadas, las ER – SCU teñidas con azul alciano se pasaron por dos cambios de Xilol (J. T. Baker, 9490-02) durante 5 minutos cada uno a Temperatura Ambiente (TA), y dos cambios de parafina (Sigma, P3558) líquida precalentada a 60°C por 1 hora cada uno. Con ayuda de un estereoscopio (Zeiss, Stemi DV4), las muestras se incluyeron en moldes de inclusión con la orientación necesaria para obtener cortes longitudinales de las ER-SCU. Se dejó solidificar en un recipiente con hielo, y los bloques se guardaron a 4°C hasta su uso.

En un micrótopo (Leica, RM2125 RTS), se realizaron cortes histológicos seriados con un grosor de 10 µm cada uno. Los cortes recién hechos se colocaron en laminillas tratadas

previamente con TESPA (3-aminopropyl-triehoxysilano, Sigma, A3648) al 4% y calentadas sobre una plancha de estiramiento (Leica, HI1220) a 42°C. Se dejaron allí toda la noche. Al siguiente día, se sometieron a una cámara de vacío por lo menos 5 horas, y se guardaron a temperatura ambiente hasta su uso.

5. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Las laminillas con los cortes en parafina se rehidrataron con cambios en un tren descendente de Xilol y Etanol (EtOH) hasta llegar a agua bidestilada (Xilol I, Xilol II, EtOH Absoluto I, EtOH Absoluto II, EtOH 96%, EtOH 70%, EtOH 50% y Agua Bidestilada; cada uno por 5 minutos). Se tiñeron con Hematoxilina de Harris por 10 minutos. Se realizó un lavado rápido con agua bidestilada y un lavado rápido con alcohol ácido al 1%. Se tiñeron con eosina (Sigma, HT110) por 3 minutos y se quitó el exceso del colorante con un lavado rápido de agua corriente. Los cortes se deshidrataron y aclararon con un tren ascendente de etanol y xilol (EtOH 90%, EtOH Absoluto I, EtOH Absoluto II, Xilol I, Xilol II; cada uno por 5 minutos). Por último, se montaron con el medio Cytoseal 60 (Thermo, 8310-4). Para obtener las fotografías a campo claro, se realizaron con un microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU).

6. Tinción con LysoTracker de las ER - SCU

Se extrajeron y lavaron los embriones que desarrollaron una ER-SCU con PBS y se tiñeron con 500 µl de LysoTracker (Invitrogen, L7528) al 0.1% en PBS durante 15 min a 37°C. Pasado ese tiempo se realizaron dos lavados rápidos con PBS y se fijaron con Paraformaldehído (PFA, Sigma, P6148) al 4% durante toda la noche a 4°C. Los embriones se deshidrataron con un tren ascendente de metanol (MetOH) en PBS-Tritón 0.1% (PBT) (MetOH 25%/PBT 75%, MetOH 50%/ PBT 50%, MetOH 75%/PBT 25%, MetOH 100%; 5 minutos cada cambio). Se aclararon los tejidos en las Solución II de Bencílicos (Anexo I) por 1 hora a TA, y una hora en la Solución I de Bencílicos a TA. Los embriones se almacenaron en solución I, en oscuridad, hasta fotografiarlos. La adquisición de las imágenes se realizó en un microscopio Olympus BX51-WI equipado con fluorescencia y una unidad de disco giratorio (DSU).

7. Extracción de RNA y retrotranscripción de las ER - SCU

Se extrajeron los embriones que desarrollaron una ER-SCU y se lavaron con PBS. Las ER – SCU se separaron del embrión y se colectaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -70°C en un utracongelador (Kelvinator, Series 100). Por cada N analizada se juntaron entre 25 y 30 ER-SCU. La extracción de RNA se realizó con el kit *NucleoSpin RNA* (Machery-Nagel, 740955) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA extraído se eluyó con 20 µl de agua libre de RNAsas en un tubo Eppendorf de las mismas características. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific) y se verificó la integridad con una electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, 16500) al 1% en buffer TBE, adicionado con 0.01% de Bromuro de Etidio (Ibi Scientific, IB0850). El gel se corrió a 70mV durante 40 minutos en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, Mini-Sub Cell GT). La retrotranscripción se realizó a partir de 2µg de RNA con la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega, M170A). El cDNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop y se llevó a una concentración de 0.5 µg/µl con H₂O-mQ.

8. PCR en tiempo real

Se preparó una solución Stock con cada par de oligos de cada gen a analizar. En un tubo Eppendorf se puso, por cada reacción, 8.2 µl de H₂O-mQ, 0.4 µl del primer Forward (Fw) 10 µM, y 0.4 µl del primer Reverse (Rv) 10 µM. Las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados se encuentran en el apartado de **Anexos II**.

Para la reacción de PCR se añadió en otro tubo Eppendorf 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 439155), 9 µl de la solución Stock de primers correspondiente, y 1 µl de cDNA 0.5 µg/µl (a los controles sin cDNA, se añadió 1 µl de H₂O-mQ). Se homogeneizaron, y dicha solución se dividió en dos partes iguales para leerse por duplicado. Se llevaron a un termociclador (Qiagen, Rotor-Gen Q), y se siguió el protocolo programado que se muestra en la **Figura 12**. Se tomó como valor relativo al gen *Ef-1a* (Enlogation factor 1-alpha), y a su vez se normalizó la expresión de cada gen con la expresión encontrada en condiciones basales de las MSC-SCU, que corresponde al pellet que sobró al terminar de rellenar los ectodermos vacíos, calculando así el doble delta Ct. Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con el Software Prism 9 (GraphPad). Se realizó, para

cada gen, una prueba t de Student, y se graficaron los promedios +/- el Error Estándar (SEM). Cada valor en las gráficas representa 4 experimentos independientes bajo las mismas condiciones. Todos los productos se amplificaron a una TM de 60° C.

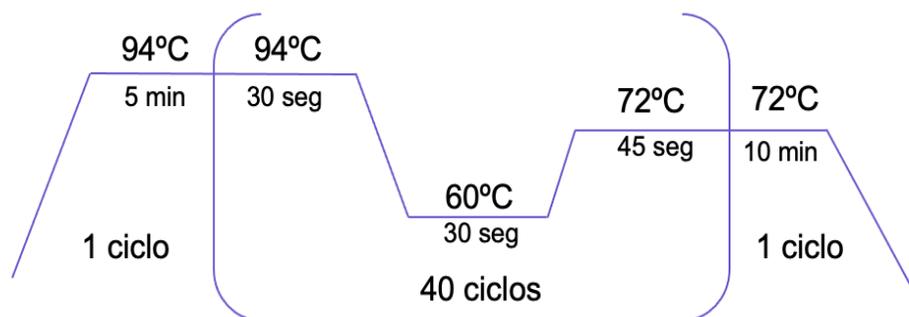


FIGURA 12. Protocolo de PCR utilizado en el termociclador

9. Inmunofluorescencias

Las laminillas con los cortes en parafina se rehidrataron con cambios en un tren descendente de Xilol y Etanol (EtOH) hasta llegar a agua bidestilada (Xilol I, Xilol II, EtOH Absoluto I, EtOH Absoluto II, EtOH 96%, EtOH 70%, EtOH 50% y Agua Bidestilada; cada uno por 5 minutos). Se trataron con una solución de Sulfato de Cobre 1mM en Acetato de Amonio pH=5 por 45 minutos a TA. Se permeabilizó con PBT durante 15 minutos, y se recuperó el antígeno con un Buffer de Citratos Inmuno/DNAretriever (Bio SB, BIO 0020) por 45 minutos a 65°C en cámara húmeda. Se bloqueó el tejido con Suero Fetal Bovino al 10% en PBS por dos horas. Se incubó el anticuerpo primario diluido 1:250 en PBS toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con PBS 5 minutos cada uno. Se incubó el anticuerpo secundario a una concentración de 1:250 en PBS por 2 horas a TA. Se quitó el exceso del anticuerpo con 2 lavados de PBS 5 minutos cada uno. Se tiñeron los núcleos con DAPI 2µg/ml de PBS por 5 minutos, y se montó con el medio Slow Fade TM (Invitrogen, S36963). En el **Anexo III** se encuentra la lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus respectivas concentraciones. La adquisición de las fotografías se realizó en un microscopio Olympus BX51-WI equipado con fluorescencia y una unidad de disco giratorio (DSU) localizado en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, sede Tercer Circuito Exterior.

10. Hibridación *in situ* whole mount en ER – SCU

La ribosonda utilizada en este trabajo fue para hibridar al transcrito de *Fgf8* en *Gallus gallus* (GenBank: NM_001012767.1). El ORF correspondiente al transcrito de dicho gen se encuentra clonado en un vector pRc/CMV (Invitrogen, V75020). Posteriormente el plásmido amplificado fue digerido con la enzima de restricción NotI, y transcrito con la RNA Polimerasa T3, añadiendo en la reacción Uridina-digoxigenina. Las ribosondas ya se encontraban sintetizadas en el laboratorio al momento de realizar la Hibridación *in situ* en las Extremidades Recombinantes.

La técnica de Hibridación *in situ* Whole Mount se divide en 5 fases: 1) Fijación y Deshidratación, 2) Rehidratación, 3) Prehibridación, 4) Hibridación, y 5) Detección.

A. Fijación y Deshidratación

Se extrajeron y lavaron los embriones que tenían ER-SCU 24 hpi con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante toda la noche a 4°C. Se deshidrataron con un gradiente ascendente de Metanoles en PBT (MetOH 25%/PBT 75%, MetOH 50%/ PBT 50%, MetOH 75%/PBT 25%, MetOH 100% I, MetOH 100% II), 5 minutos cada uno. Los embriones se almacenaron en Metanol absoluto a -20°C.

B. Rehidratación

Se rehidataron los tejidos con un gradiente descendente de Metanoles en PBT (MetOH 100%; MetOH 75%/BPT 25%; MetOH 50%/PBT 50%; MetOH 25%/PBT 75%; PBT 100% I, PBT 100% II), 5 minutos cada uno.

C. Prehibridación

Los embriones se dejaron en Peróxido de Hidrógeno al 6% en PBT en oscuridad durante 1 hora a TA. Se lavaron 3 veces con PBT 5 min cada uno y se incubaron con la enzima PK cuyo tiempo de exposición y temperatura dependerá del gen a hibridar (consultar Anexo I). Los tejidos se cambiaron a una solución de PFA 4% + Glutaraldehído (Sigma, GS882) 0.2% por 20 minutos a TA. Se lavaron 2 veces con PBT 5 min cada uno. Después, se pasaron al Buffer de Hibridación durante 3 horas a 65°C (Para mayor información de las soluciones usadas, consultar Anexo I).

Minutos antes de terminar las 3 horas, se preparó la ribosonda a una relación de 1:100 en Buffer de Hibridación. Se calentó a 80°C por 2 minutos en Thermoblock (Corning, D1100)

e inmediatamente se pasó a un recipiente con hielo. Los embriones se dejaron en la ribosonda recién preparada durante toda la noche a una temperatura de 65°C a 68°C en el Thermoblock.

D. Hibridación

Se retiró la ribosonda y los embriones se lavaron 2 veces con la solución I durante 1 hora cada uno a 66°C en un Horno de Hibridación (Boekel Scientific, 136400). Después se cambió la solución I por una combinación de Solución I con Solución III (1:1) durante 10 minutos, y dos cambios con la Solución III por 30 min cada uno a 65°C. Se lavaron 3 veces TBST/Levamisole 2mM 10 min cada uno a TA. Se bloquearon con Suero de Cabra al 10% en TBST/Levamisole (Solución de Bloqueo) por 3 horas a TA con agitación. Se incubaron con el anticuerpo α -Digoxigenina diluido en la solución de bloqueo 1:2000 durante toda la noche a 4°C con agitación.

E. Detección

Se retiró el anticuerpo y los embriones se lavaron 15 veces con Levamisole/TBST 10 minutos cada uno, a TA con agitación. Se dejaron en el último lavado durante toda la noche a TA con agitación.

Para la detección, los embriones se lavaron 2 veces con NTMT + Levamisole 1mM, 15 min cada uno, y se adicionó el AP sustrato BM Purple (Roche, 11442074001) y se dejaron en oscuridad. El revelado puede tardar de 1 hora a 24 hrs. Cuando terminó la reacción, se lavaron 2 veces con NTMT 30 min cada uno a TA, y se almacenaron en PFA al 2% a 4°C. La adquisición de las imágenes se realizaron en un estereoscopio Zeiss (Zeiss, Axio Zoom.V16) acoplado con una cámara (Zeiss, AxioCam 503).

XI. RESULTADOS

1. MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical generan Extremidades Recombinantes (ER-SCU)

Para determinar la capacidad de diferenciación y morfogenética de las MSC-SCU primero se evaluó si las MSC podían formar Extremidades Recombinantes quiméricas entre pollo/humano. Para ello, se realizaron los trasplantes de los ectodermos rellenos con las MSC – SCU y se analizó su formación a las 24, 48 y 72 horas post implantación (hpi) tras una tinción de azul alciano de las mismas. Como resultado, se obtuvieron en dichos tiempos Extremidades Recombinantes hechas con MSC – SCU, a las cuales de ahora en adelante se denominarán ER-SCU (**Figura 13-A**). Para evidenciar la presencia de las MSC en las ER-SCU se buscó un marcador que fuera específico para células de humano, y no presentara una reacción cruzada con las células del embrión de pollo receptor. Para ello, se decidió marcar la proteína perteneciente al Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I (HLA). Para verificar que el anticuerpo α -HLA marcara con especificidad las células de humano se tiñó, mediante Inmunofluorescencias, una biopsia de músculo humano, y a la par un tejido de embrión de pollo. Como resultado se obtuvo un marcaje exclusivamente en el tejido de humano (**Figura 13-B y Anexo V**).

Una vez comprobado que el marcaje α -HLA permite identificar las poblaciones de células de humano de las células de embrión de pollo, se realizaron las Inmunofluorescencias y RT-qPCR en las ER - SCU. Como resultado, se observó que a las 24 hpi, las ER-SCU presentan expresión del gen HLA (Promedio: 1.58 ± 0.2 ; p-valor = 0.065; 4 experimentos independientes), y que las MSC-SCU se localizan en el centro de la extremidad recombinante siendo rodeadas por el ectodermo proveniente de un primordio de embrión de pollo (**Figura 13-B y -C**). Ambos resultados concluyen que las MSC-SCU pueden formar Extremidades Recombinantes y dicho sistema podría servir para estudiar los procesos de diferenciación y morfogénesis que pueden tener estas células.

2. Las ER-SCU disminuyen de tamaño conforme al tiempo

Uno de los primeros resultados al analizar la ER-SCU a las 24 hpi, 48 hpi y 72 hpi fue que se observó un decremento en la longitud de las ER-SCU relacionado con mayor tiempo de

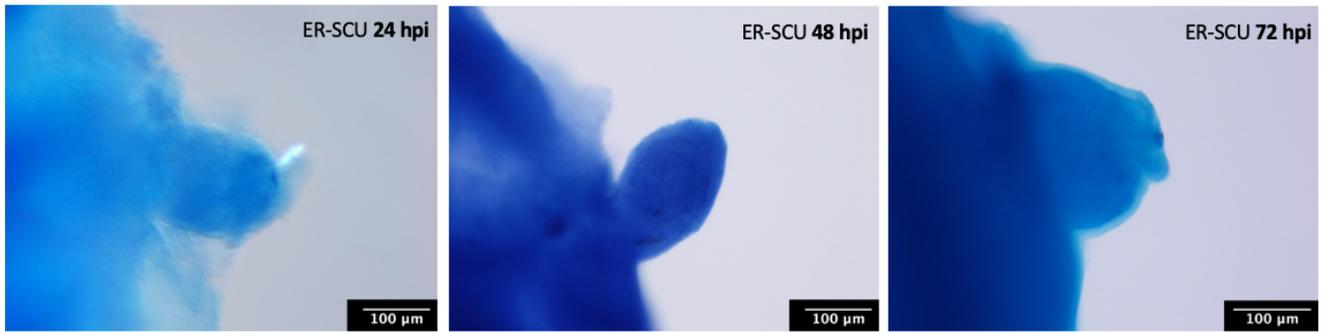
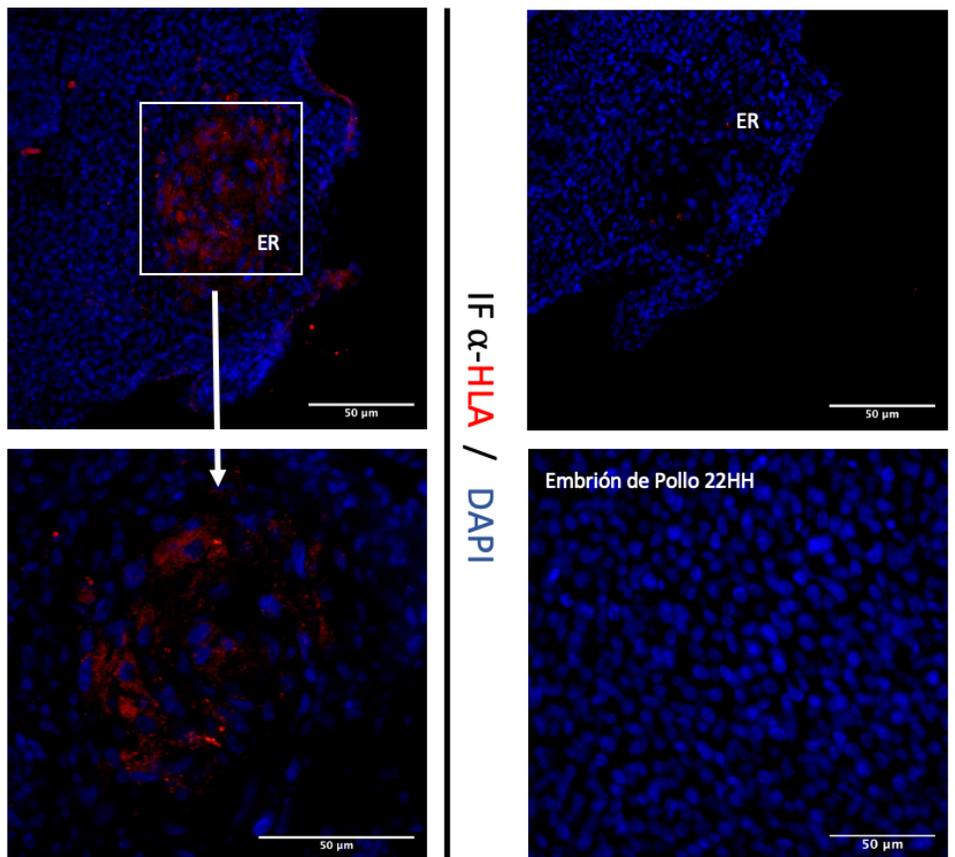
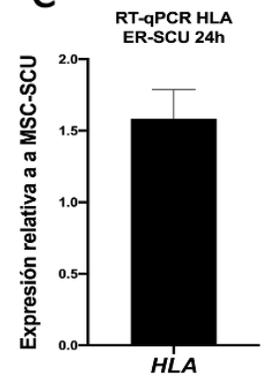
A**Tinción de Azul Alciano****B****Controles Negativos****C**

Figura 13. MSC provenientes de Sangre de Cordón Umbilical forman Extremidades Recombinantes. (A) Imágenes representativas de las ER-SCU a diferentes tiempos post-implantación teñida con Azul Alciano. (B). Inmunofluorescencias α -HLA en ER-SCU 24h post-implantación obtenidas por Microscopía de Epifluorescencia acoplado a una Unidad de Disco Giratorio. Núcleos celulares marcados con DAPI, proteína HLA en rojo. (C). RT-qPCR para la detección del transcrito de HLA-1 en las ER-SCU 24 hpi.

incubación, teniendo el menor tamaño observado a las 72 hpi (**Figura 13-A**). Este resultado sugiere que en las ER-SCU pueden estar ocurriendo un proceso de muerte celular, que las MSC-SCU puedan estar migrando e ingresando en el tejido del embrión de pollo receptor, y/o que se esté perdiendo la señalización de la AER que media el crecimiento próximo-distal del primordio durante el desarrollo embrionario, por lo que se procedió a indagar en cada una de esas posibilidades.

3. Existe un mayor marcaje con LysoTracker en el ectodermo de las ER-SCU 24 hpi que disminuye conforme al tiempo.

Como los procesos de muerte celular son una de las posibilidades que explican la disminución de tamaño observada en las ER-SCU, se obtuvieron ER-SCU de los 3 tiempos evaluados y se realizó una tinción con LysoTracker en ellas. Como resultado, se observó una mayor marca en las ER-SCU 24 hpi (**Figura 14-A**). En este tiempo, se observó una marca positiva a lo largo del ectodermo de la recombinante siendo más evidente en las zonas distales de la ER-SCU que corresponde a la zona de la AER. Sin embargo, la señal del LysoTracker disminuyó conforme a los tiempos evaluados, siendo la señal a las 72 hpi casi nula (**Figura 14-C**). Estos resultados indican que existe una posible muerte celular observada en el ectodermo de la ER-SCU a las 24 hpi que no se mantiene a lo largo del tiempo.

4. A las 24 hpi no se detectó muerte celular mediada por apoptosis en las ER-SCU

Para evaluar si la marca detectada por LysoTracker en las ER-SCU 24 hpi (**Figura 14-A**) desencadena algún evento de muerte celular mediada por apoptosis directamente en las MSC-SCU que conforman la Extremidad Recombinante, se obtuvieron ER-SCU 24 hpi, se cortaron y se realizaron en ellas Inmunofluorescencias α -Caspasa 3 activa. Como resultado no se observó alguna célula positiva en ningún corte estudiado (**Figura 15-A**). Para evidenciar el funcionamiento de la técnica y del anticuerpo, se usaron como control positivo cortes de extremidades posteriores de embrión de pollo etapa 30HH (**Figura 15-B**), donde la muerte celular en los interdígitos mediada por apoptosis ya ha sido reportada (Gañan et al., 1996).

Tinción de LysoTracker

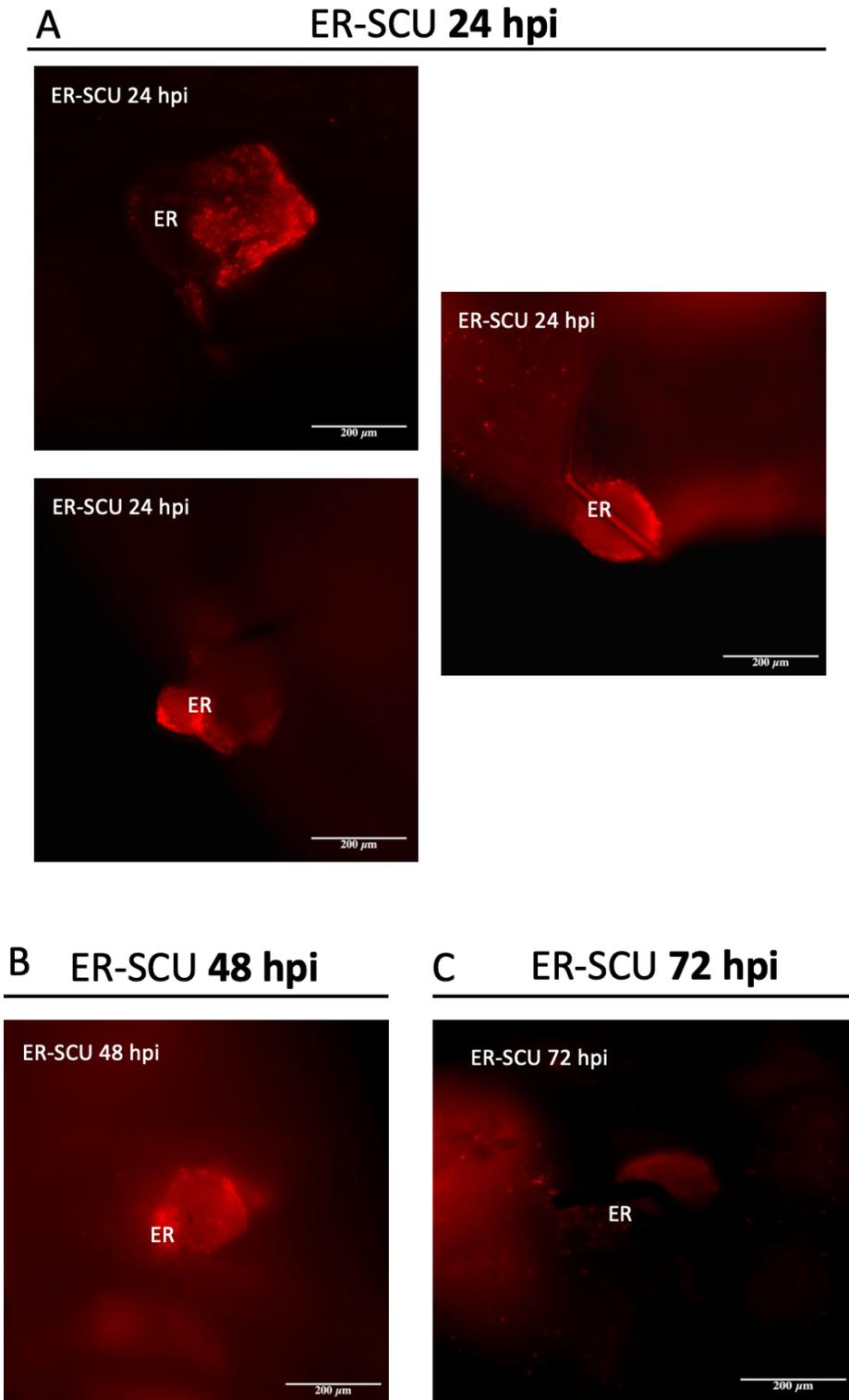


Figura 14. Existe una muerte celular en el ectodermo de las ER-SCU a las 24 hpi que disminuye conforme al tiempo. Se muestran imágenes representativas de ER-SCU tenidas con LysoTracker a las 24 hpi (A), 48 hpi (B), y 72 hpi (C) obtenidas por Microscopía de Epifluorescencia acoplado a una unidad de Disco Giratorio. Barra de Escala: 200 μm .

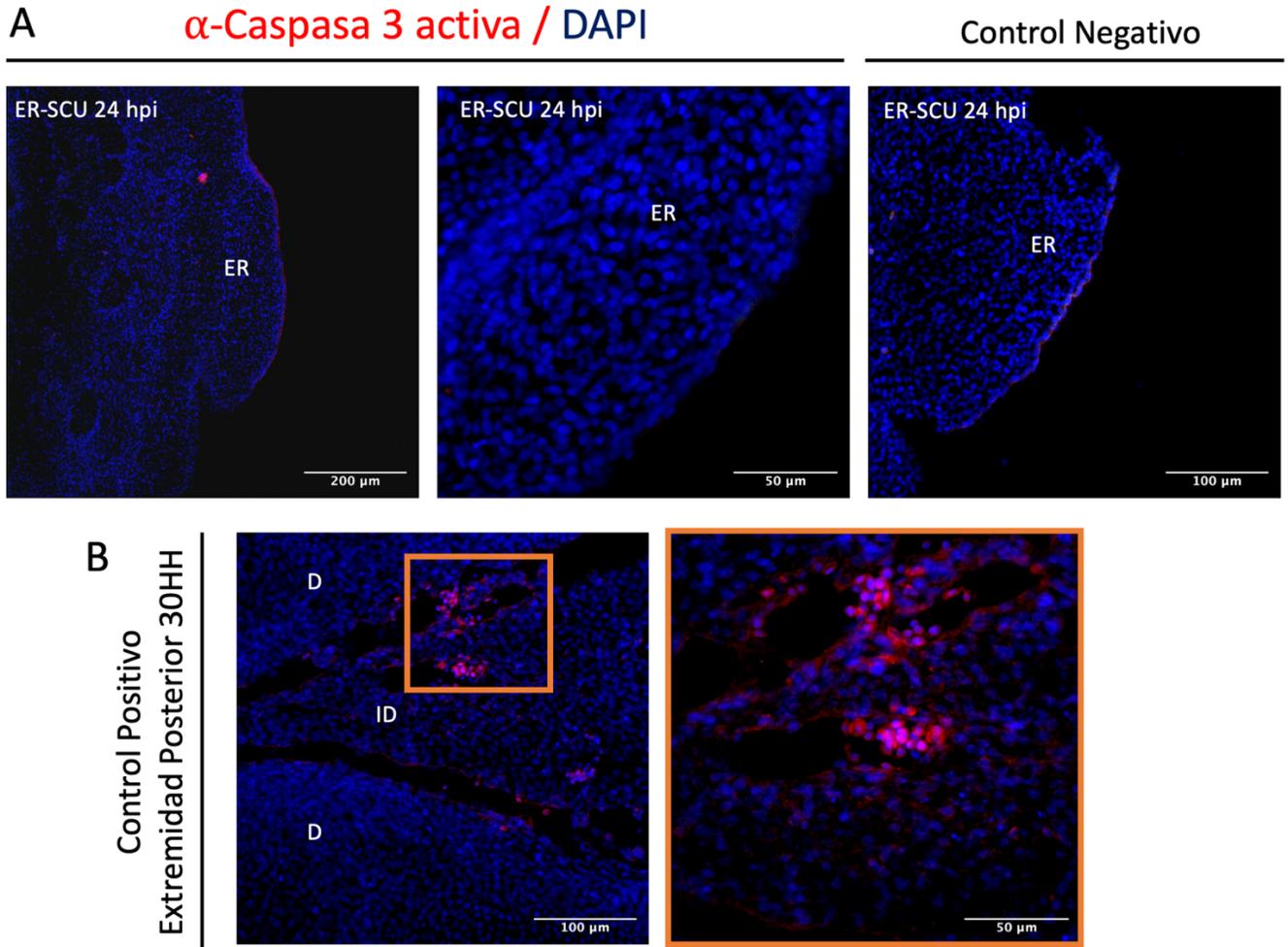


Figura 15. A las 24 hpi no se encontró una muerte celular mediada por apoptosis en las ER-SCU. (A) Se muestran imágenes representativas a diferentes aumentos de Inmunofluorescencias para la detección de Caspasa-3 activa en cortes de las ER-SCU obtenidas mediante Microscopía de Epifluorescencia acoplado a una Unidad de Disco Giratorio. (B) Control Positivo de la Inmunofluorescencia α -Caspasa3 activa. Corte de una extremidad posterior de embrión de pollo etapa 30HH. “D”: Dígito; “ID”: Interdígito.

Los resultados anteriores muestran que, aunque existe una posible muerte celular identificada por un marcaje de LysoTracker a las 24 hpi, la marca más intensa sólo se limita a este tiempo (**Figura 14-A**) y, en su mayoría, a las células que conforman el ectodermo de la ER-SCU. Esto reafirma que las MSC-SCU sobreviven en el sistema de Extremidades Recombinantes y se les puede estudiar allí otros procesos celulares.

5. A las 24 hpi disminuye la expresión de Fgf8 en las ER – SCU

Dado que se detectó muerte celular en el ectodermo y en las MSC de las ER-SCU a las 24 hpi, y dicha marca era más notoria en el ectodermo distal, se estudió la expresión de *Fgf8*, característica de la AER durante el desarrollo embrionario. Como primera aproximación se probó la sonda de *Fgf8* recién transcrita en embriones de pollo en diferentes etapas de desarrollo (**Anexo VI**). Al comprobar la funcionalidad de la sonda, se realizaron Hibridaciones *in situ* en las ER-SCU 24 hpi (**Figura 16**). Como resultado, en 7 de 9 ER-SCU 24 hpi analizadas, no se detectó el transcrito de *Fgf8* en el ectodermo, mientras que en 2 ER-SCU sí se detectó (**Figura 16-A**). La primera de las ER-SCU positiva, la señal se encontró a lo largo de todo el ectodermo, mientras que la segunda ER-SCU positiva sólo tuvo la señal en la mitad del ectodermo. Como control de expresión, se utilizaron los primordios de las extremidades de los embriones de pollo receptores (**Figura 16-B**). Con estos resultados se concluye que la expresión de *Fgf8* se pierde desde las 24 hpi; sin embargo, la posibilidad que *Fgf8* se re-expresara en tiempos posteriores no se evaluó.

6. Las ER-SCU no presentan una tinción de azul alciano aparente en los tiempos evaluados

Dado que los primeros procesos de diferenciación celular en el desarrollo de la extremidad es hacia el linaje condrogénico, se evaluó en las ER-SCU la capacidad de diferenciación a dicho linaje por la presencia de condensaciones mesenquimales condrogénicas (**Figura 13-A**). Como resultado se observaron algunos puntos con mayor tinción a lo largo de las recombinantes en los tiempos evaluados, lo cual indica una mayor presencia de proteoglicanos. Sin embargo, en ningún tiempo evaluado se observó una clara condensación central teñida con azul alciano. Con los resultados anteriores se puede concluir que en los tiempos donde se evaluaron ER-SCU no hay condensaciones condrogénicas evidentes ni la síntesis exacerbada no la secreción de una matriz extracelular característica de cartílago.

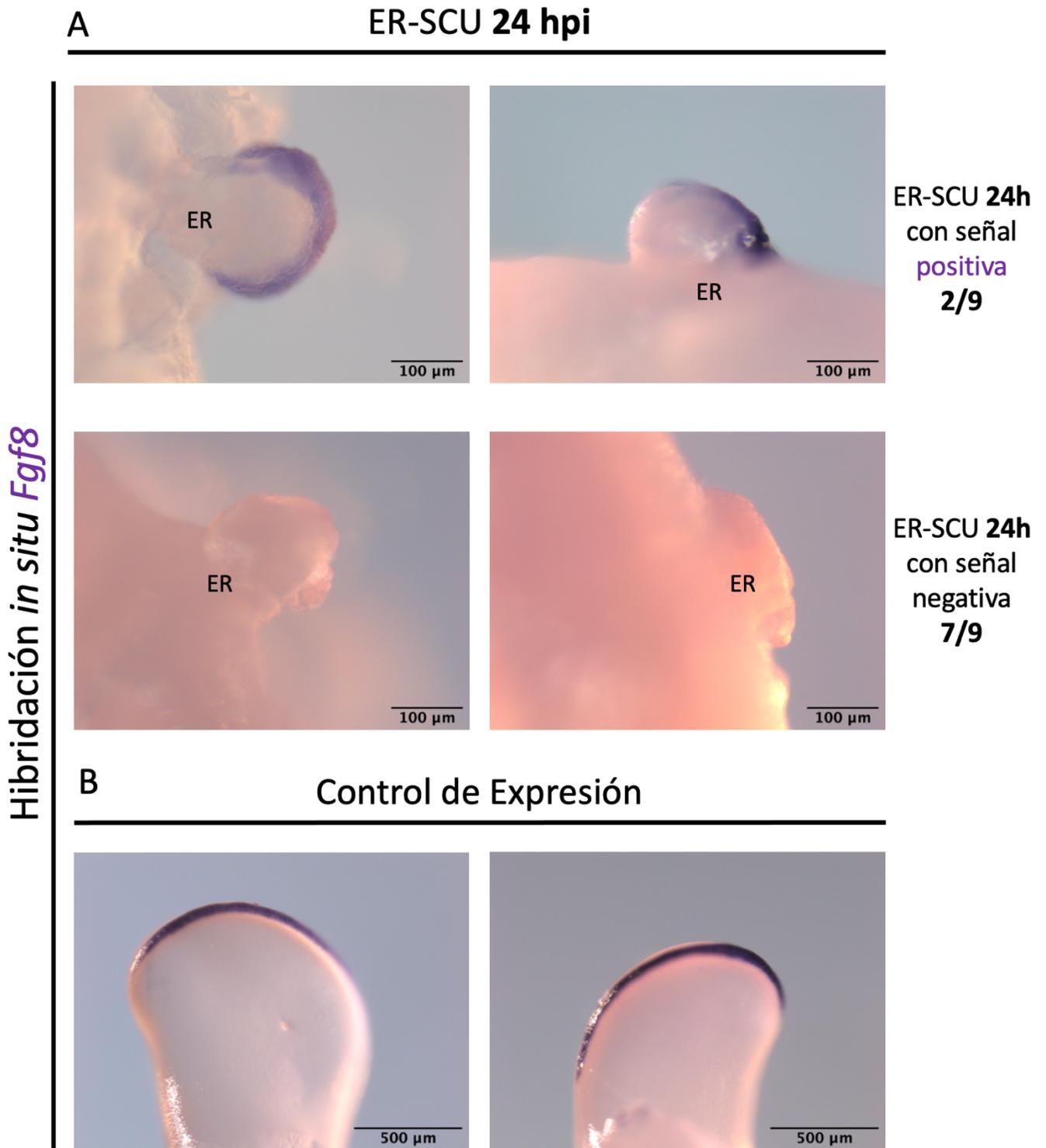


Figura 16. A las 24 hpi disminuye la expresión de *Fgf8* en las ER-SCU. (A) Se muestran imágenes representativas de las Hibridaciones *in situ* para *Fgf8* en las ER-SCU 24 hpi obtenidas por Microscopía Estereoscópica, y se indica la frecuencia de las ER-SCU con señal positiva y negativa. (B) Imágenes representativas del control de expresión que corresponde a los primordios de extremidades anteriores del embrión de pollo receptor.

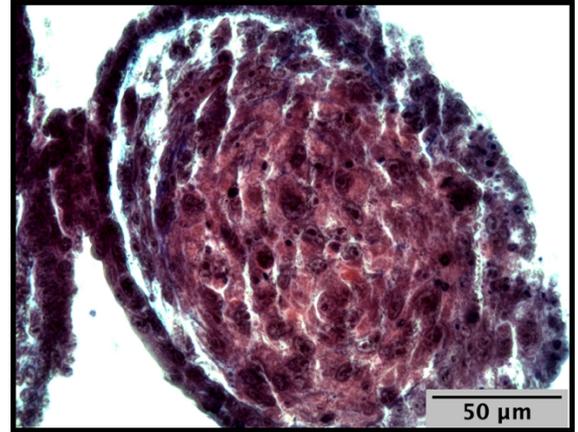
7. Las MSC – SCU presentan cambios morfológicos en las ER – SCU y una asociación a condensaciones mesenquimales

Para evaluar las morfologías celulares de las MSC-SCU en las Extremidades Recombinantes, las ER-SCU previamente teñidas con azul alciano se incluyeron en parafina, se cortaron y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (**Figura 17**). A las 24 hpi las ER-SCU presentan una morfología redondeada y permanecen condensadas, con una tinción de azul alciano prácticamente nula, que sólo se logra observar entre las MSC y el ectodermo. A las 48 hpi, las MSC presentan una variedad de morfologías. Algunas siguen con un fenotipo redondeado, mientras que otras se visualizan con una morfología alargada. La tinción de azul alciano sigue sin cambios con respecto a las ER-SCU 24 hpi, y se sigue observando en las zonas contiguas del ectodermo donde casi no hay presencia de células. A las 72 hpi, las MSC presentan una morfología alargada, y están localizadas en una condensación celular que corre a lo largo del eje P-D de la ER-SCU. En este tiempo, la tinción de azul alciano se observa con un mayor marcaje en los centros de las condensaciones observadas, lo cual sugiere una síntesis y secreción de ECM.

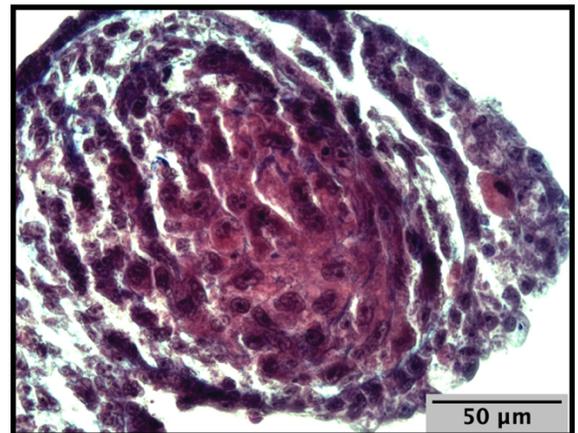
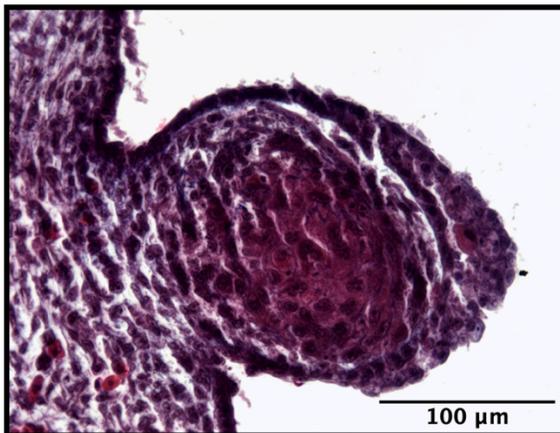
Otro resultado observado en las histologías fue un engrosamiento de todo el ectodermo que se mantuvo en los 3 tiempos evaluados, resultando en un epitelio estratificado (**Figura 17**). Por otro lado, la región del ectodermo correspondiente a la AER también presentó cambios ya que a las 24 hpi presentó una organización en epitelio cuboidal estratificado, y a las 48 hpi cambió a un epitelio plano simple que se mantuvo hasta las 72 hpi.

Con los resultados anteriores se puede concluir que dentro de las ER-SCU, las MSC lleven a cabo cambios morfológicos y de organización a condensaciones celulares que pueden estar asociados a eventos tempranos de diferenciación celular. También, los cambios notorios en los ectodermos de las ER-SCU pueden ser debido a la muerte celular o en cambios moleculares y de señalización del mismo antes descritos (**Figura 14, 15 y 16**).

ER-SCU 24 hpi



ER-SCU 48 hpi



ER-SCU 72 hpi

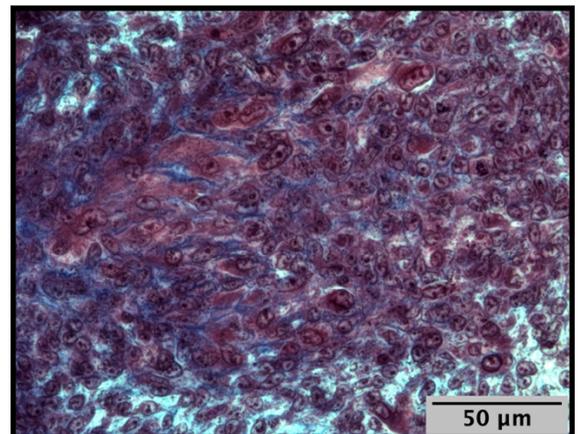
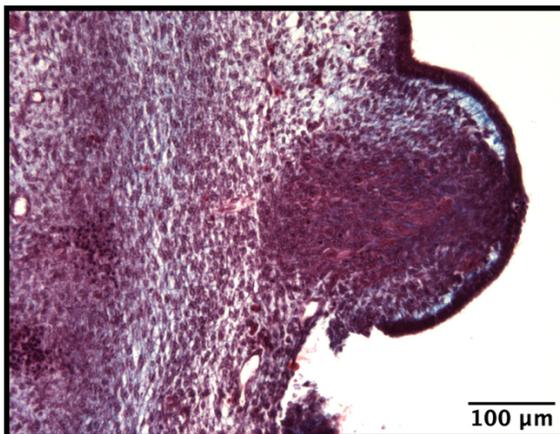


Figura 17. Las MSC-SCU presentan cambios morfológicos y una asociación a condensaciones mesenquimales. Se muestran imágenes representativas de las tinciones de Hematoxilina y Eosina en las ER-SCU previamente teñidas con Azul Alciano obtenidas por Microscopía de Campo Claro. Primera Fila: ER-SCU 24 hpi; Segunda Fila: ER-SCU 48 hpi; Tercera Fila: ER-SCU 72 hpi. En la columna derecha se muestran los aumentos de las ER-SCU correspondientes a su contraparte izquierda. Los núcleos celulares se marcan en morado, citoplasma en rojo/rosa, y en azul los componentes de la Matriz Extracelular.

8. En las ER-SCU 24 hpi se encuentran sobre-expresados genes asociados a la diferenciación de diversos linajes presentes en la extremidad

Para evaluar la diferenciación celular de las MSC-SCU en las ER-SCU se evaluaron mediante RT-qPCRs la expresión de diferentes genes asociados a los linajes condrogénicos, tenogénicos y osteogénicos. Dado que los eventos de compromiso celular se dan en los primeros estadios de la diferenciación celular, se evaluó la expresión de los genes en las ER-SCU 24 hpi.

De esta forma, para estudiar el compromiso celular hacia linaje condrogénico se evaluó la expresión de los genes *Sox9*, *Col2a1* (Colágena tipo II, alpha I), *Agrecano*, *Hif1a* (Subunidad alpha del factor 1 inducible por hipoxia) y *Gdf5*. Para estudiar el compromiso celular hacia linaje tenogénico se evaluó la expresión de los genes *Scleraxis* (*Scx*), *Tenomodulina* (*Tnmd*) y *Mohawk* (*Mkx*). Para estudiar el proceso de diferenciación hacia linaje osteogénico se evaluó la expresión del gen *Runx2*; y como gen de normalización (Housekeeping) se utilizó la expresión de *Ef-1a* (Factor de Elongación 1-alpha).

Para probar todas las secuencias de los oligonucleótidos diseñados, se realizó una RT-qPCR con RNA extraído de Células Mesenquimales Estromales provenientes de Médula Ósea cultivadas en condiciones de micromasas con medio suplementado con TGF- β como control positivo. Así, se comprobó que todos los pares de oligos funcionaron ya que amplificaron y se obtuvieron los amplicones correspondientes al diseño *in silico*, con excepción de *Tnmd* (**Anexo VII**). Una vez comprobada la funcionalidad de los oligos, se estudió la expresión de los genes en las ER-SCU 24 hpi. Se evaluaron con 4 experimentos independientes y se normalizó la expresión basal de todos los genes con el gen Housekeeping; y a su vez se hizo una segunda normalización con la expresión de los genes en el pellet sobrante de MSC-SCU tras terminar de rellenar los ectodermos vacíos durante la generación de las ER-SCU. De esta forma se obtuvo el Delta-Delta CT.

Como resultado en la evaluación de los genes condrogénicos se encontró una expresión al alta de los genes *Sox9* (Promedio: 3.99 ± 0.29 veces más que las MSC-SCU), *Agrecano* (Promedio: 3.57 ± 0.05) y *Hif1a* (Promedio: 2.03 ± 0.07); y una expresión a la baja de *Gdf5* (Promedio 0.017 ± 0.002). Por otro lado, la expresión de *Col2a1* se inhibió en todos

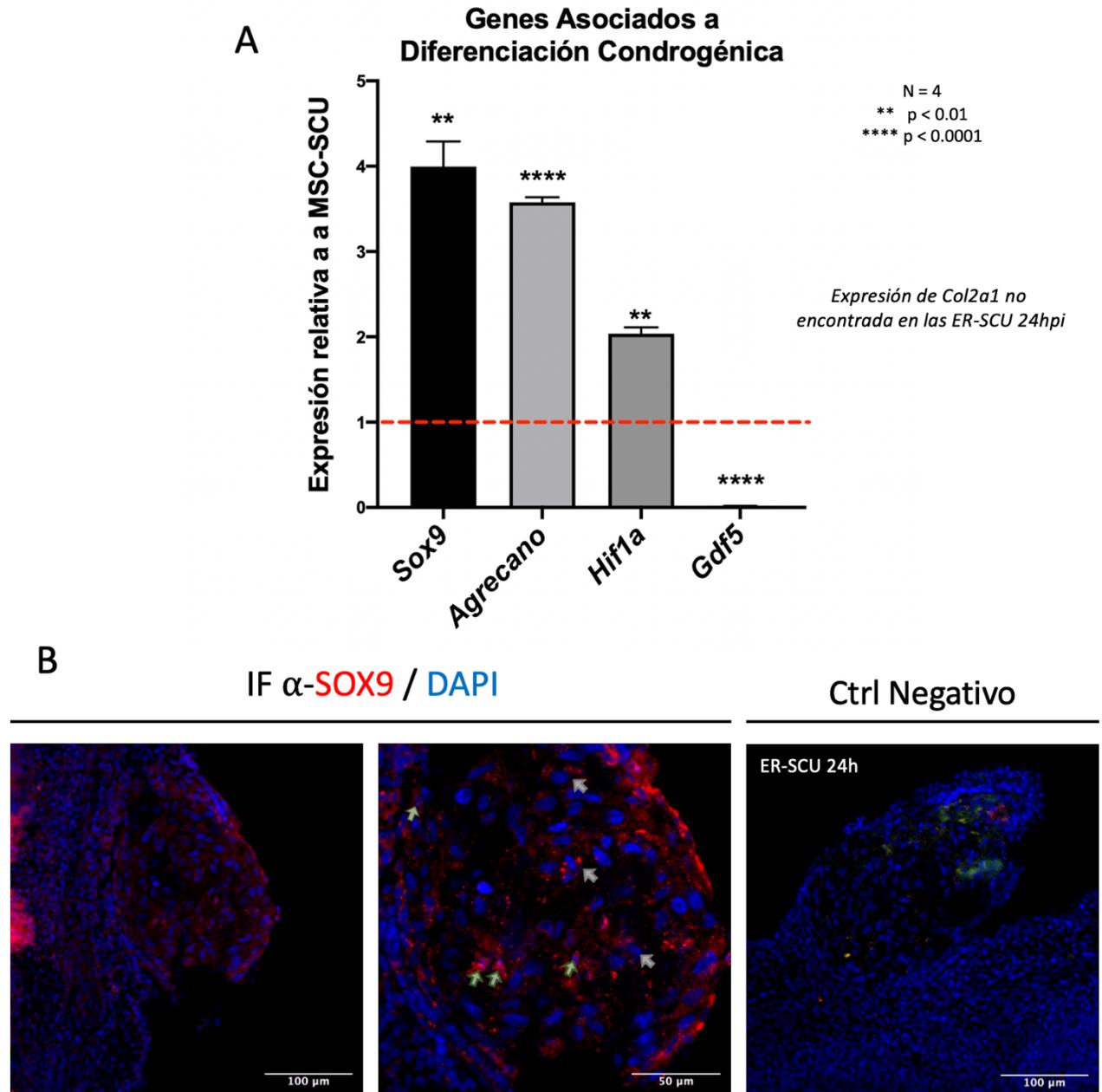


Figura 18. En las ER-SCU 24h se encuentran sobre-expresados genes relacionados con la diferenciación condrogénica. (A) RT-qPCRs de 4 experimentos independientes. Se evaluó la expresión de *Sox9*, *Col2a1*, *Agrecano*, *Hif1a* y *Gdf5*. Se muestran los Promedios \pm SEM. (**) = $p < 0.01$; y (****) = $p < 0.0001$. Se muestra una línea roja en “1” indicando la normalización de los valores con respecto a la expresión obtenida en las MSC-SCU antes de ser puestas en las Extremidades Recombinantes. (B) Se muestra una inmunofluorescencia α -SOX9 en ER-SCU 24h post-implantación obtenida mediante Microscopía de Epifluorescencia acoplado a una Unidad de Disco Giratorio. La segunda imagen corresponde a un aumento óptico de la muestra, y la tercera imagen es el Control Negativo. Con flechas verdes se muestran las células con un marcaje nuclear, y con flechas grises las células con un marcaje citoplasmático. Se muestra en rojo el marcaje de SOX9, y en azul los núcleos celulares marcados con DAPI.

los experimentos evaluados ya que no se encontró su expresión en las ER-SCU, mientras que las MSC-SCU si tenían expresión en la condición inicial. Al hacer el análisis estadístico con la prueba paramétrica “t de Student”, se encontró que *Sox9*, *Agrecano*, *Hif1a* y *Gdf5* tienen una diferencia de expresión estadísticamente significativa a comparación de las MSC-SCU con un P valor de 0.002, <0.0001, 0.0047, y <0.0001 respectivamente (**Figura 18-A**).

Para detectar la localización de las células SOX9⁺ en la ER-SCU 24h, se realizaron cortes e Inmunofluorescencias α -SOX9. Como resultado se encontró que las células SOX9⁺ se encuentran distribuidas en las ER-SCU 24 hpi. En algunas células la marca se observó en el espacio citoplasmático, mientras que en otras células (aunque en menor número), la marca se encontró de forma nuclear (**Figura 18-B**). Los resultados anteriores sugieren fuertemente que las MSC-SCU se comprometen al linaje condrogénico a las 24 horas posteriores de ser introducidas en el sistema de Extremidades Recombinantes.

Por otro lado, se evaluaron los genes asociados a diferenciación tenogénica. Como resultado se encontró que el gen *Scleraxis* (*Scx*) está altamente sobre-expresado en las ER-SCU 24 hpi (Promedio: 371.61 ± 55.32 veces más que las MSC-SCU), mientras que para el gen *Mohawk* (*Mkx*) se encontró disminuida su expresión (0.24 ± 0.02 veces la expresión de MSC-SCU). Finalmente, el gen *Tenomodulina* (*Tnmd*) no se encontró expresado en ninguna condición experimental ni control (**Figura 19-A y Anexo VII**). Al realizar los ensayos estadísticos, se concluyó que la diferencia de la expresión de *Scx* y *Mkx* son estadísticamente significativas con un P Valor de 0.021, y < 0.0001, respectivamente. En cuanto al gen *Tnmd*, no se pudo concluir algo ya que su expresión no se encontró en los controles ni las condiciones experimentales.

Para obtener el patrón de expresión de SCX en las ER-SCU 24h, se realizó una Inmunofluorescencia α -SCX. Las células SCX⁺ se encuentran distribuidas en toda la ER-SCU 24 hpi, e incluso en las somitas del embrión de pollo receptor que sirvió como control positivo de expresión (**Figura 19-B**). La mayoría de las células SCX⁺ tienen marca nuclear. Estos resultados, junto con los experimentos de las RT-qPCRs concluyen que las células de la ER-SCU 24 hpi se encuentran comprometidas hacia linaje tenogénico.

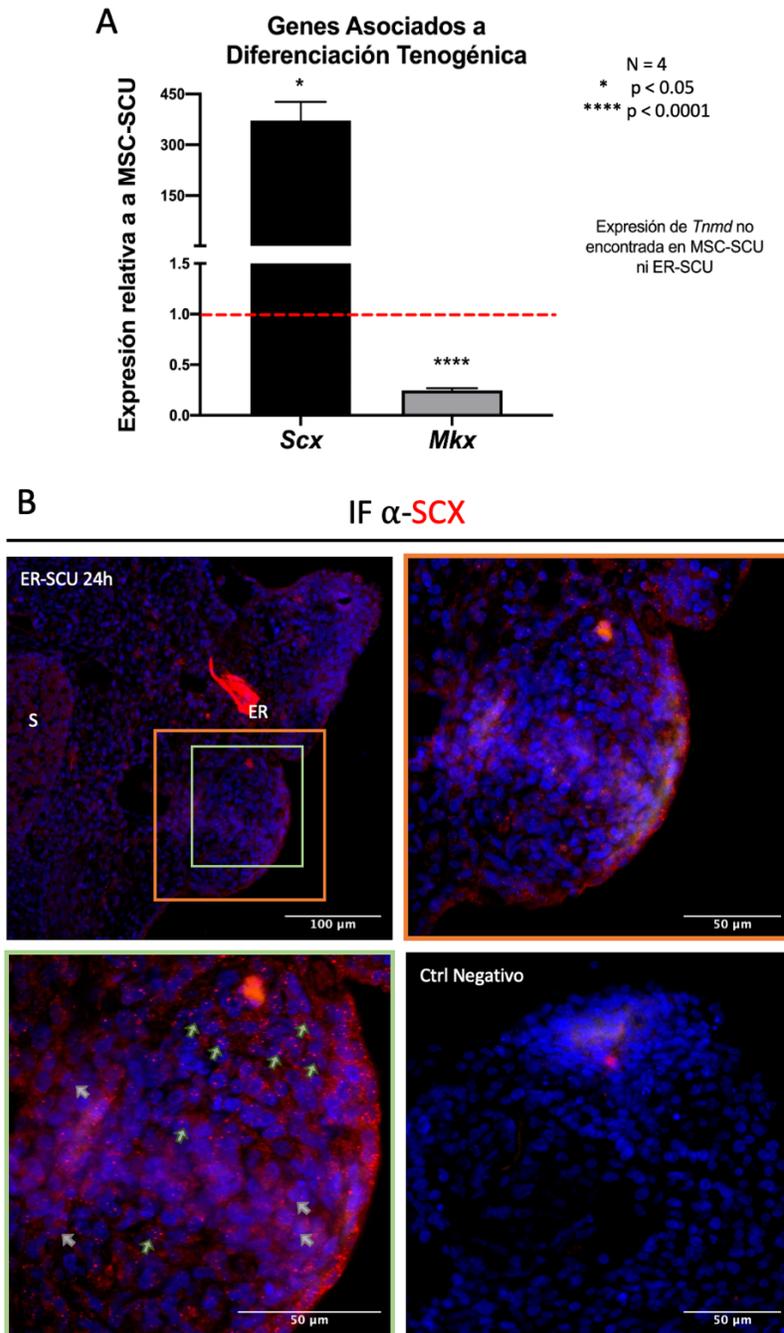


Figura 19. En las ER-SCU 24h se encuentra sobre-expresado *Scx*, gen relacionado al compromiso celular hacia linaje tenogénico. (A) RT-qCRs de 4 experimentos independientes. Se evaluó la expresión de *Scx*, *Tnmd*, y *Mlx*. Se muestran los Promedios \pm SEM. (*) = $p < 0.05$; y (****) = $p < 0.0001$. Se muestra una línea roja en “1” indicando la normalización de los valores con respecto a la expresión obtenida en las MSC-SCU antes de ser puestas en las Extremidades Recombinantes. (B) Se muestra una Inmunofluorescencia α -SCX en ER-SCU 24 hpi obtenida mediante Microscopía de Epifluorescencia acoplado a una Unidad de Disco Giratorio. “S” = Somita del embrión de pollo receptor. Con flechas verdes se muestran las células con un marcaje nuclear, y con flechas grises las células con un marcaje citoplasmático. Se marca en rojo a SCX y en azul los núcleos celulares teñidos con DAPI.

Como última parte del estudio de la expresión de genes, se evaluó el gen *Runx2*, asociado a compromiso celular hacia linaje osteogénico (**Figura 20**). Como resultado se encontró una expresión al alta (Promedio: 9.96 ± 0.46 veces más que las MSC-SCU). Al realizar los ensayos estadísticos se concluyó que la diferencia en la expresión es estadísticamente significativa, con un P valor igual a 0.0027. Estos resultados indican que las ER-SCU 24 hpi se encuentran comprometidas al linaje osteogénico.

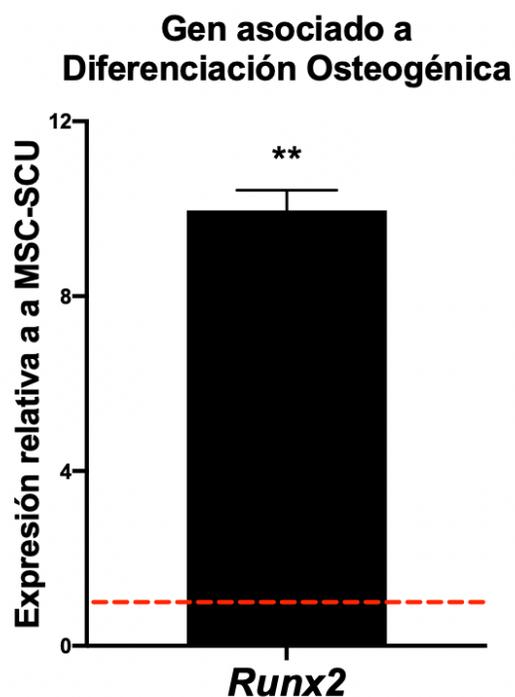


Figura 20. A las 24 hpi se encuentra sobre-expresado el gen *Runx2*, gen asociado a diferenciación osteogénica. RT-qCRs de 4 experimentos independientes. Se evaluó la expresión de *Runx2*. Se muestran el Promedio \pm SEM. (**)= $p < 0.01$. Se muestra una línea roja en “1” indicando la normalización de los valores con respecto a la expresión obtenida en las MSC-SCU antes de ser puestas en las Extremidades Recombinantes.

XII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el potencial de diferenciación y morfogenética de las MSC-SCU mediante la técnica de Extremidades Recombinantes, la cual recapitula el desarrollo embrionario de la extremidad al conservar los centros organizadores del primordio embrionario.

Los resultados de este trabajo demuestran que las Células Estromales Mesenquimales provenientes de Sangre de Cordón Umbilical (MSC-SCU) son capaces de responder a las señales de una extremidad embrionaria dando origen a Extremidades Recombinantes realizadas al conjuntar el ectodermo del primordio de un embrión de pollo con estas células. Esto sugiere que existe conservación de las señales moleculares que existen tanto en el primordio de la extremidad embrionaria, así como de las interacciones epitelio-mesénquima que ocurren durante el desarrollo entre diversas especies (revisado en: Young, 2017). Varios trabajos han reportado la generación de las ER al conjuntar los componentes entre especies como pollo/codorniz (Frederick & Fallon, 1982), pollo/pato (Pautou, 1973), o pollo/tortuga (Fallon, 1985). Sin embargo, en un trabajo se reportó que la generación de ER entre pollo y mesodermo de mamíferos como ratón, cerdo, conejo o humano no era posible ya que no presentaban una vascularización aparente (Marian Fernandez-Teran et al., 1999). Esta declaración queda retada ya que en otros trabajos sí se ha demostrado la generación de las ER entre pollo/mamífero como pollo/rata (Jorquera, 1971), pollo/ratón (Kuhlman & Niswander, 1997), y con este trabajo, entre pollo/humano.

Para demostrar e identificar que las MSC-SCU forman parte de las ER-SCU se utilizó el marcaje y detección del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés “Major Histocompatibility Complex”), conocido mejor, en células de humanos, como Antígeno Leucocitario Humano Clase I (HLA-I, por sus siglas en inglés “Human Leukocyte Antigen”). Este marcaje funcionó en las ER-SCU ya que HLA-I se encuentra expresado en todas las células humanas nucleadas (Vandiedonck & Knight, 2009), y se mantiene en nuestro sistema.

En este trabajo se observó que en las ER-SCU a las 24, 48 y 72 hpi ocurre una disminución del tamaño longitudinal de las RLs respecto al tiempo evaluado. Esto podría deberse a diversos factores como: 1) la falta de proliferación de las MSC-SCU dentro de las ER-SCU,

2) que alguno de los componentes de las ER-SCU (ectodermo o MSC-SCU) se encuentren en procesos de muerte celular, y/o que 3) se esté perdiendo la señalización característica del crecimiento próximo-distal.

La falta de proliferación de las MSC-SCU, aunque no se evaluó en este trabajo, puede estar ocurriendo ya que en estudios comparativos entre diferentes fuentes de MSC han encontrado que las MSC-SCU tienen una tasa baja de proliferación *in vitro*, y son la fuente que tiene la mayor capacidad de estar en un estado de senescencia celular después del segundo pase del cultivo celular (Kern et al., 2006). Sin embargo, en el mismo, no se evaluó la activación de la señalización de mTOR, que se ha reportado ser necesaria en los cambios morfológicos de las células senescentes (revisado en: Bent et al., 2016), ni otros aspectos moleculares, epigenéticos, o de metabolismo clave ya descritos durante la senescencia celular (revisado en: Hernandez-Segura et al., 2018). Aunque la falta de proliferación de las MSC esté explicando la disminución de las ER-SCU conforme al tiempo, esta se debe confirmar mediante la falta de detección de PCNA, p53, Ki67, o análogos de timidina por inmunomarcaje. Por otra parte, también sería necesario detectar marcadores de senescencia celular como p21 o p16, junto a la señalización de mTOR y confirmar que esté ocurriendo dicho proceso celular y no sea un arresto del ciclo celular de forma temporal característico de la quiescencia celular.

Para evaluar si la muerte celular en las ER-SCU esté explicando la disminución de tamaño observado, se evaluó la presencia de la proteína Caspasa 3-activa que está relacionada con procesos de muerte mediada por apoptosis (Mirkes, 2008). Aquí, no se detectó marcaje positivo ni en el ectodermo ni en las MSC-SCU que conforman las ER-SCU. Durante el desarrollo embrionario temprano de la extremidad se pueden detectar varias zonas de muerte celular en el primordio como son la Zona Necrótica Anterior, la Zona Necrótica Posterior y el Parche Opaco (ANZ, PNZ y OP, respectivamente por sus siglas en inglés). Dichas zonas de muerte celular se han descrito principalmente en el mesodermo del primordio de la extremidad (Saunders, 1966), aunque también se han descrito pocos puntos de muerte en la AER del ectodermo (Todt & Fallon, 1984). En las ER-SCU 24 hpi las zonas ANZ, PNZ y OP descritas en el primordio embrionario de la extremidad no se detectan, aún cuando se utilizó el ectodermo de las etapas de desarrollo correspondientes a la identificación de dichas

zonas. Este resultado es similar con los trabajos reportados donde tampoco se detecta una muerte celular en los componentes mesodérmicos de ER hechas con células de interdígito de pollo (Ros et al., 1997). Esto sugiere fuertemente que la muerte celular de la ANZ, PNZ y OP del primordio de la extremidad no está mediada por el componente ectodérmico, y que al estar ausentes las señales de muerte en nuestro sistema, se permite la supervivencia de las MSC-SCU en las ER-SCU.

La muerte celular en la ANZ y PNZ se han descrito como esenciales para el proceso morfogenético durante el desarrollo de la extremidad ya que eliminan células de los márgenes posteriores y anteriores que no se integran a la región central donde ocurre la condensación de células condrogénicas (Montero et al., 2021). Por ello, es posible que la muerte celular programada no se detecte en las ER-SCU sino hasta que los progenitores se encuentren ubicados en las regiones morfogenéticas correspondientes como pudiera ser la condensación detectada por los cortes histológicos hasta las 72 hpi. Por lo anterior, es interesante saber si existe una muerte celular a las 72 hpi que esté participando en un remodelamiento tisular del proceso morfogenético de las ER-SCU.

Otro resultado que se obtuvo al estudiar la muerte celular en el ectodermo de las ER-SCU por el marcaje de los organelos ácidos con LysoTracker, fue que a las 24 hpi había una marca extensa en el ectodermo distal que disminuyó conforme al tiempo evaluado. Dicha marca no coincide con la falta de marcaje apoptótico encontrado en la inmunodetección de Caspasa-3 activa en las ER-SCU 24 hpi. Esto puede explicarse debido a que el ectodermo de las ER-SCU 24 hpi podrían estar acumulando cuerpos ácidos que no son suficientes para llevar a cabo la activación de la cascada de las caspasas, posiblemente por la falta de homooligomerización de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK que promueven la liberación del Citocromo C de la mitocondria al citosol (Ren et al., 2010), y que no se esté llevando a cabo la muerte celular del ectodermo; o que, por otro lado, se esté llevando a cabo una muerte celular independiente de la activación de la vía de las Caspasas. Se ha descrito que las células comprometidas a morir durante la muerte interdigital tienen una mayor expresión de Catepsinas lisosomales (V. Zuzarte-Luis et al., 2007). Con ello, se ha demostrado que una sobreexpresión de Catepsina D en las células promueve la translocación nuclear del Factor Inductor de Apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés “Apoptosis Inducing-Factor”) que promueve la permeabilización mitocondrial sin la activación de las Caspasas (Vanessa

Zuzarte-Luis et al., 2007). Por estas razones, queda por evaluar si está activa esta última vía de señalización en las ER-SCU.

Aunado a lo anterior, estudios donde evaluaron muerte celular detectada por rompimiento de DNA en el ectodermo de ER hechas con interdígitos de embrión de pollo, encontraron un único marcaje a las 72 hpi, justo en el ectodermo distal de las ER, coincidente con la regresión y pérdida estructural de la AER (Ros et al., 1997). Nuestros resultados son similares ya que a las ER-SCU 24 hpi presentan una pérdida de la AER del ectodermo detectada por histología al mismo tiempo que se presenta el mayor marcaje de LysoTracker. Esto sugiere que existen factores en el mesodermo interdigital que a las 72 horas se pierden o ganan provocando la regresión de la AER; mientras que las MSC-SCU se encuentran en dicho estado desde un principio, lo cual tiene como resultado el acortamiento en el tiempo de aparición de dicho fenómeno.

Al comprobar que existe una pérdida estructural de la AER en las ER-SCU 24 hpi coincidentes de forma espacio temporal con el marcaje de LysoTracker, evaluamos la expresión de *Fgf8*, señal característica de la AER que media el crecimiento proximodistal del primordio embrionario. Como resultado se encontró que sólo 2 de 9 ER-SCU 24 hpi evaluadas tuvieron expresión de *Fgf8*, teniendo 1 de ellas el marcaje en la mitad del ectodermo, y la otra en la periferia completa de la ER-SCU. Sin embargo, el marcaje de esta última ER-SCU se observó más en el componente mesodérmico que en el ectodérmico.

La expresión de *Fgf8* en el desarrollo de la extremidad está dada desde la especificación de la AER. En respuesta a la señalización de FGF10 del mesénquima del primordio, *Fgf8* es inducido a expresarse en los progenitores de la AER resultando en la formación del loop de señalización positiva entre FGF8 derivado de la AER, y FGF10 del mesénquima (Zeller et al., 2009). Primordios de la extremidad que no expresan *Fgf8* tienen una AER más pequeña, y la activación de Shh de la ZPA se retrasa, resultando en la pérdida de algunos elementos esqueléticos (Lewandoski et al., 2000). Otra de las señales que mantiene la expresión de las FGF de la AER es la ZPA expresado en el mesénquima posterior del primordio de la extremidad. Perlas embebidas en FGF mantienen la expresión de *Shh* tras la remoción mecánica de la AER (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994). Adicionalmente, en antagonista GREM1 es requerido en el mesénquima subectodermal para

la retrasmisión de la señal de SHH a la AER y promover la expresión de los FGF en dicha zona (Michos et al., 2004; Zúñiga et al., 1999). Juntos estas señales definen el loop de señalización SHH-GREM1-FGF (Zeller et al., 2009).

Al observar que en la mayoría de las ER-SCU 24 hpi se presenta una pérdida de expresión de *Fgf8*, se propone que este fenómeno sea dado por la pérdida del loop de señalización entre FGF8 de la AER y FGF10/BMP4 del mesénquima adyacente, o de la pérdida de señalización entre SHH-GREM1-FGF entre la AER y la ZPA. La segunda idea donde la falta de señalización de la ZPA esté mediando la pérdida de la expresión de *Fgf8* en las ER-SCU 24 hpi es menos probable ya que se ha descrito que en la formación de ER con mesodermo anterior del primordio de la extremidad (sin ZPA) se mantiene la expresión de *Fgf8* ya sea en presencia o ausencia de condensados provenientes de la ZPA, o con perlas embebidas con SHH puestas en uno de los márgenes de las ER (Elisa Piedra et al., 2000; Kuhlman & Niswander, 1997). Esto indica que, en el sistema de Extremidades Recombinantes, el mantenimiento de la expresión de *Fgf8* es independiente de la señalización de la ZPA. Con este estudio, se refuerza la idea que la pérdida de expresión de *Fgf8* observada en las ER-SCU 24 hpi esté siendo en mayor grado por la falta de expresión de *Fgf10* y/o *Bmp4* en las MSC-SCU. He de resaltar que la expresión de *Fgf10* y *Bmp4* en las MSC-SCU no se ha evaluado ni reportado. También, existe la posibilidad que la señalización de *Fgf8* se re-induzca en el ectodermo de las ER-SCU posteriormente a las 24 hpi, lo cual queda por analizar.

La capacidad morfogénica de las MSC-SCU en las ER-SCU se observó al evaluar la organización y morfología de las células mediante histologías a diferentes tiempos. Las MSC-SCU presentan cambios morfológicos, y solamente hasta las 72 hpi se observó una asociación celular a condensaciones mesenquimales. Sin embargo, las ER-SCU presentan una menor capacidad morfogénica a comparación de las ER hechas con mesénquima disociado del primordio de la extremidad, ya que a las 72 hpi estas últimas presentan condensaciones de cartílago que son preconfiguraciones de los elementos óseos del autópodo, con presencia de otras estructuras bien definidas como las articulaciones (Elisa Piedra et al., 2000). Cabe resaltar que en las ER realizadas con células del primordio de la extremidad como componente mesodérmico se ha reportado una mayor capacidad

morfogenética si se implanta un fragmento intacto de la ZPA en uno de los bordes de las extremidades recombinantes (Frederick & Fallon, 1982; Kuhlman & Niswander, 1997), que tiene como resultado una mayor capacidad de formar dígitos. En otras palabras, la presencia de los centros organizadores del ectodermo y del mesodermo potencian la capacidad de diferenciación y organización de las células dentro de las ER. Con estos últimos datos se hipotetiza que las ER-SCU podrían presentar mayores eventos morfogenéticos si se les añade un fragmento de ZPA en uno de los bordes de la recombinante, o incluso se podría utilizar células mesenquimales transfectadas con *Shh* que se ha demostrado que es suficiente para imitar la función de la ZPA (Riddle et al., 1993). Por otro lado, también se ha observado que la capacidad morfogenética de las células usadas en el sistema de extremidades recombinantes se potencia si éstas adquieren durante los primeros estadios post transplante una especificación celular del eje P-D, y A-P. Células recién extraídas de los primordios de las extremidades, adquieren la expresión de *Meis1*, *Hoxa11*, y *Hoxa13* de manera similar al primordio de la extremidad en desarrollo (Cooper et al., 2011; Maria A. Ros et al., 1994; Roselló-Díez et al., 2011b). Sin embargo, si las células de los primordios son cultivadas, disminuyen su potencial morfogenético al perder la expresión de estos marcadores, resaltando que sólo se tiene como resultado la formación de un segmento del autópodo. Cuando las mismas células se mantienen en cultivo con FGF8, WNT3A, y Ácido Retinoico; vías de señalización en las cuales actúan en las células mesequimales del primordio de la extremidad en etapas tempranas del primordio, recuperan su potencial morfogenético en el sistema de ER (Roselló-Díez et al., 2011a). Por ello, es de interés saber si se induce la expresión de los genes que especifican los segmentos del eje P-D, y su vez potenciar la morfogénesis de las ER-SCU si se ponen en el sistema MSC-SCU previamente tratadas con FGF8, WNT3A y Ácido Retinoico.

La presencia de las condensaciones mesenquimales en las ER-SCU 72 hpi sugiere que las MSC-SCU iniciaron algún proceso de diferenciación y organización dentro de nuestro sistema, como lo demuestra el análisis de expresión de genes condrogénicos, tenogénicos, y osteogénicos. Para el caso de los genes condrogénicos se encontró que los niveles de expresión de *Sox9*, *Hif1a*, y *Agrecano* son elevados a las 24 hpi, mientras que *Col2a1* no se encontró expresado. SOX9 es el regulador maestro de la condrogénesis y se encuentra

expresado desde el compromiso celular hacia dicho linaje hasta el final del estado hipertrófico de los condrocitos (Ng et al., 1997; Zhao et al., 1997). El hecho que este gen se encuentre sobre-expresado a las 24 hpi podría ser por una proliferación selectiva de estos progenitores. Las MSC-SCU se han propuesto como progenitores condrogénicos per se ya que al ser expandidas en medio control (no condrogénico), y ser transplantadas a la cápsula renal de un ratón, éstas pueden formar agregados con células morfológicamente parecidas a condrocitos y a una tinción positiva de Azul Alciano (Sacchetti et al., 2016). Por otro lado, la expresión de *Sox9* podría estar aumentada, ya que no existe la señal de FGF8 de la AER, que se sabe que mantiene a las células en estado indiferenciado, sin iniciar el compromiso celular hacia linajes osteocondrogénicos (Crossley et al., 1996). De la misma forma, la sobre-expresión de *Sox9* también se puede deber a la sobre-expresión de *Hif1a* encontrada a las 24 hpi. HIF1A participa en el compromiso celular hacia linaje condrogénico al iniciar la expresión de *Sox9* en células regionalizadas del primordio de la extremidad en condiciones hipóxicas (Amarilio et al., 2007).

SOX9 es un factor transcripcional que participa en la diferenciación del cartílago. Los genes blanco de SOX9 durante el desarrollo incluyen otros miembros de la familia Sox como SOX5 y SOX6 (Akiyama et al., 2002) que en triada activan genes específicos de cartílago como *Col2a1* y *Agrecano* (Véronique Lefebvre et al., 1998). Esto podría estar explicando la sobre-expresión de *Agrecano* también encontrado en las ER-SCU 24 hpi; sin embargo, si dicha triada estuviera activa en las ER-SCU, también debería encontrarse la expresión de *Col2a1*, que se expresa de manera similar a *Agrecano* durante la Condrogénesis (Bell et al., 1997); lo cuál, no sucedió. Esto podría deberse a las diferencias de los estados epigenéticos de la cromatina de las MSC-SCU con respecto a la cromatina de las células mesenquimales del primordio de la extremidad embrionaria. Hoy en día existe más evidencia sobre la dispensabilidad de SOX9 en los eventos condrogénicos donde el estado activo de la cromatina que corresponde a sus elementos blanco, no son estrictamente dependientes de SOX9 (Liu et al., 2018). Concordando con esto, en MSC provenientes de Médula Ósea se han encontrado marcas epigenéticas de activación de la cromatina cerca de genes endocondrales antes de someterlas a medios condrogénicos (Herlofsen et al., 2013). Con esto, se hipotetiza que tal vez existe combinaciones únicas entre diversos factores de transcripción

y/o epigenéticos, que en su mayoría incluyan a SOX9, y sean los que medien la activación de los genes condrogénicos de forma individual.

De manera contraria, se encontró una expresión a la baja de *Gdf5* en las ER-SCU 24 hpi. La participación de GDF5 está mayormente descrito durante la formación de las articulaciones del esqueleto apendicular (Buxton et al., 2001). Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo se ha descrito que su función es importante durante las condensaciones mesenquimales condrogénicas aumentando las moléculas de adhesión célula-célula, específicamente de las uniones GAP (Coleman & Tuan, 2003). El hecho de encontrar una expresión a la baja de *Gdf5* correlaciona con el tiempo en que no se observaron condensaciones celulares en las ER-SCU. Sin embargo, es posible que la sobreexpresión de este gen ocurra en tiempos posteriores, y esté participando en la formación de condensados vistos a las 72 hpi.

Al evaluar la capacidad de diferenciación tenogénica, de manera sorprendente se encontraron altos niveles de expresión de *Scx*. Esto puede explicarse como que la diversidad de factores que influyen en la expresión al alta de la expresión de *Scx* estén convergiendo en las ER-SCU 24 hpi. TGF β es considerado entre los principales reguladores de diferenciación y el crecimiento de los tejidos conjuntivos. En el desarrollo de la extremidad, TGF β 2 está relacionado con la formación de tendones, y en condiciones *in vitro* TGF β 1 promueve la expresión de *Scx* (Lorda-Diez et al., 2009; Ramón Merino et al., 1998) donde también tiene un papel esencial para mantener activa la transcripción de *Scx* en los precursores de los tendones a lo largo del desarrollo y hasta etapas adultas (Pryce et al., 2009). También se ha descrito que el antagonismo de la señalización canónica de BMP induce la expresión de *Scx* por los ligandos como TGF β 2, Noggina, y BMP3 (Gamer et al., 2008; Lorda-Diez et al., 2010; Schweitzer et al., 2001). La expresión de *Scx* también se ha descrito que depende del tiempo de exposición a BMP en combinación con otras proteínas represoras, como SnoN e Id2, que se expresan en células mesenquimales de las extremidades, bloqueando el efecto condrogénico (Lorda-Diez et al., 2014).

De la misma manera, moléculas pertenecientes a la superfamilia de TGF β , como los factores de Crecimiento Diferencial (GDFs, por sus siglas en inglés “Growth Differentiation Factor”) GDF-6, y GDF-7, así como TGF β 3, BMP-12, y el Factor de Crecimiento derivado

de Plaquetas (PDGF-DD por sus siglas en inglés “Platelet-Derived Growth Factor”) se han utilizado para diferenciar a las MSC de diversas fuentes hacia tenocitos (Ciardulli et al., 2020; Falcon et al., 2019; Javanshir et al., 2020; Orfei et al., 2019). Por esta razón, la señalización de estas moléculas podría estar fuertemente activa en las ER-SCU 24 hpi.

Aunado a lo anterior, se ha descrito que la inhibición de WNT/ β -catenina es necesaria y suficiente para permitir la inducción de *Scx* en los primordios de la extremidad embrionaria (García-Lee et al., 2021). Por esta razón, se puede hipotetizar que la expresión ectodérmica de la señalización de WNT en las ER-SCU se esté perdiendo a las 24 hpi, de manera similar a lo demostrado con la expresión de *Fgf8*. La presencia de los inductores de la expresión de *Scx* adicional a la pérdida de la señalización que mantiene a los progenitores tenogénicos indiferenciados, explicaría la alta expresión de *Scx* que se observó a las 24 hpi. En el mismo experimento se encontró una baja expresión de *Mkx*. Esto puede deberse a que la expresión de este gen se da después de iniciar la expresión de *Scx* en las células progenitoras de tendones, sobreponiéndose con las zonas de expresión de *Scx* (Anderson et al., 2006). De esta forma, las MSC-SCU se encuentran comprometidas al linaje tenogénico a las 24 hpi, y quedaría por evaluar si genes como *Mkx* o *Tnmd* se expresan en tiempos posteriores al evaluado.

Al evaluar el compromiso celular hacia linaje osteogénico, se encontró una sobre-expresión de *Runx2*. RUNX2 es el principal factor de transcripción involucrado en el compromiso celular y esencial para la osteogénesis (Komori et al., 1998; Otto et al., 1997). Aunque la participación de RUNX2 durante el desarrollo del esqueleto apendicular es de forma transitoria al sólo estar expresado entre la aparición de condrocitos hipertróficos y la diferenciación de osteoblastos es importante para el correcto funcionamiento de los progenitores óseos, su migración y la organización de su citoesqueleto (Adhami et al., 2014; Takeda et al., 2001). Sin embargo, se ha demostrado que la unión de RUNX2 no correlaciona con la activación o supresión de la expresión de genes (Meyer et al., 2014), lo cual indica que existen co-reguladores aún no identificados que son importantes para la regulación transcripcional de RUNX2 (Rauch & Mandrup, 2021). Entre los co-reguladores puede estar Osterix que se ha identificado su participación en los procesos osteogénicos durante el desarrollo de la extremidad (Day et al., 2005), o incluso los genes identificados por Machine

Learning y knock-downs en MSC humanas provenientes de Médula Ósea como TEAD4, MEF2A, SNAI2, ELK4, SMAD3, PITX1, NK3.1 y JUNB (Rauch et al., 2019). Evaluar la expresión de estos co-rreguladores en las ER-SCU sería interesante y daría información sobre una apropiada diferenciación osteogénica de las MSC en nuestro sistema.

Las MSC-SCU son capaces de comprometerse hacia el linaje condrogénico, osteogénico y tenogénico en el sistema de Extremidades Recombinantes, demostrando así que mantienen su multipotencialidad de diferenciación *in vitro* hacia estos linajes. El hecho que puedan comprometerse a los linajes evaluados en este trabajo en distinto grado sugiere que las MSC-SCU son una población celular heterogénea cuyos componentes individuales tienen distintas capacidades de diferenciación. Es interesante pensar que algunas MSC-SCU puedan ser progenitores bipotenciales o tripotenciales al tener expresado al mismo tiempo dos o más genes maestros de diferenciación hacia linajes diferentes; sin embargo, esto no se evaluó en el presente trabajo. Aunado a lo anterior, la detección de la mayor expresión de *Scx* en las ER-SCU 24 hpi sugiere que las MSC-SCU se componen de un mayor número de células competentes a las señales de la ER para comprometerse al linaje tenogénico. No obstante, falta evaluar si las ER-SCU tienen los componentes necesarios para completar la diferenciación y obtener en ellas condrocitos, osteocitos o tenocitos en tiempos posteriores.

XIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se generaron Extremidades Recombinantes realizadas al conjuntar el ectodermo de un primordio de extremidad embrionario de pollo con MSC-SCU humanas. En dicho sistema las MSC-SCU son capaces de sobrevivir y tener capacidades morfogénicas al poder agregarse en condensaciones mesenquimales. También, las MSC-SCU se encuentran comprometidas a linajes osteogénico, condrogénico y tenogénico, siendo este último el de mayor grado. Con esto, las ER-SCU son un excelente sistema para estudiar los eventos moleculares y celulares tempranos que actúan en un espacio y tiempo definidos durante la diferenciación de las MSC-SCU.

Finalmente, este trabajo abre brecha al demostrar que no solamente se pueden utilizar células derivadas de los componentes mesodérmicos de los primordios de las extremidades en el sistema de Extremidades Recombinantes, si no también células ya caracterizadas de poseer una capacidad de diferenciación mesengénicas *in vitro*, y así poder evaluar su capacidad morfogénica y diferenciación de manera tridimensional.

XIV. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la expresión de los genes estudiados en ER-SCU 48 hpi, y 72 hpi.
2. Estudiar si existe la re-expresión de *Fgf8* en ER-SCU mediante ISH en ER-SCU 48 hpi, y 72 hpi.
3. Obtener el patrón de expresión de SOX9, SCX, y RUNX2 en ER-SCU 72 hpi, donde ya se evidenció la formación de condensaciones mesenquimales por histología.
4. Evaluar la expresión de genes relacionados a diferenciación miogénicos como *MyoD*, *Myf4*, o *Myf5*.
5. Evaluar la hipótesis de potenciar la capacidad morfogénica de las MSC-SCU al realizar ER-SCU incluyendo un fragmento de ZPA; ya sea por el mesodermo posterior de los primordios de extremidades de embriones de pollo, o por transfección de las MSC-SCU con *Shh*
6. Evaluar la expresión basal de *Fgf10* en las MSC-SCU
7. Realizar ER-SCU con MSC-SCU previamente transfectadas con *Fgf10*
8. Realizar ER-SCU con MSC-SCU previamente tratadas con FGF8, WNT3A y Ácido Retinoico

XV. BIBLIOGRAFÍA

- Adhami, M. D., Rashid, H., Chen, H., & Javed, A. (2014). Runx2 activity in committed osteoblasts is not essential for embryonic skeletogenesis. *Connective Tissue Research*, 55(SUPPL. 1), 102–106. <https://doi.org/10.3109/03008207.2014.923873>
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., & De Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1017802>
- Akiyama, H., Kim, J. E., Nakashima, K., Balmes, G., Iwai, N., Deng, J. M., Zhang, Z., Martin, J. F., Behringer, R. R., Nakamura, T., & De Crombrughe, B. (2005). Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504750102>
- Amarilio, R., Viukov, S. V., Sharir, A., Eshkar-Oren, I., Johnson, R. S., & Zelzer, E. (2007). HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*, 134(21), 3917–3928. <https://doi.org/10.1242/dev.008441>
- Amthor, H., Christ, B., Weil, M., & Patel, K. (1998). The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Current Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70251-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70251-9)
- Anderson, D. M., Arredondo, J., Hahn, K., Valente, G., Martin, J. F., Wilson-Rawls, J., & Rawls, A. (2006). Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Developmental Dynamics*, 235(3), 792–801. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20671>
- Arnold, H. H., & Braun, T. (1996). Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: A review. *International Journal of Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1387/ijdb.8735947>
- Arques, C. G., Doohan, R., Sharpe, J., & Torres, M. (2007). Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.02873>
- Balinski, B. (1965). *An introduction to Embryology* (Segunda). WB Saunders.

- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V., & Tabin, C. J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020216>
- Bell, D. M., Leung, K. K. H., Wheatley, S. C., Ling Jim Ng, Zhou, S., Kam Wing Ling, Mai Har Sham, Koopman, P., Tam, P. P. L., & Cheah, K. S. E. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature Genetics*, *16*(2), 174–178. <https://doi.org/10.1038/ng0697-174>
- Bénazet, J. D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Gonçalves, A., Martin, J. F., Zuniga, A., Naef, F., & Zeller, R. (2009). A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1168755>
- Bent, E. H., Gilbert, L. A., & Hemann, M. T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes and Development*, *30*(16), 1811–1821. <https://doi.org/10.1101/gad.284851.116>
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & De Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/8792>
- Bianco, P. (2014). “Mesenchymal” stem cells. In *Annual review of cell and developmental biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013132>
- Bieback, K. (2004). Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-625>
- Bluteau, G., Julien, M., Magne, D., Mallein-Gerin, F., Weiss, P., Daculsi, G., & Guicheux, J. (2007). VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.024>
- Broxmeyer, H. E. (2005). Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytotherapy*. <https://doi.org/10.1080/14653240510027190>
- Brunstein, C. G., & Wagner, J. E. (2006). Umbilical Cord Blood Transplantation and Banking. *Annual Review of Medicine*. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.051804.123642>
- Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1995). Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development*.

- Buxton, P., Edwards, C., Archer, C., & Francis-West Phillipa. (2001). Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5) and Skeletal Development. *THE JOURNAL OF BONE & JOINT SURGERY, Volume 83*(Issue 1), p S23-S30.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*.
<https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Chan, B. P., Chan, K. M., Maffulli, N., Webb, S., & Lee, K. K. H. (1997). Effect of basic fibroblast growth factor: An in vitro study of tendon healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. <https://doi.org/10.1097/00003086-199709000-00031>
- Charité, J., de Graaff, W., Shen, S., & Deschamps, J. (1994). Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell*, 78(4), 589–601. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90524-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90524-X)
- Charité, J., McFadden, D. G., & Olson, E. N. (2000). The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development*, 127(11), 2461–2470.
<https://doi.org/10.1242/dev.127.11.2461>
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K. C., Pepicelli, C. V, Gan, L., Lee, B., & Johnson, R. L. (1998). *Limb and kidney defects in*. 19(may), 51–55.
- Chevallier, A., & Kieny, M. (1982). On the role of the connective tissue in the patterning of the chick limb musculature. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1007/BF00848416>
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Gañan, Y., Macias, D., Merino, R., & Hurle, J. M. (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Developmental Biology*.
[https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00066-6)
- Chuong, C. M., Widelitz, R. B., Jiang, T. X., Abbott, U. K., Lee, Y. S., & Chen, H. M. (1993). Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Progress in Clinical and Biological Research*.
- Church, V., Nohno, T., Linker, C., Marcelle, C., & Francis-West, P. (2002). Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *Journal of Cell Science*.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00152>

- Ciardulli, M. C., Marino, L., Lamparelli, E. P., Guida, M., Forsyth, N. R., Selleri, C., Porta, G. Della, & Maffulli, N. (2020). Dose-response tendon-specific markers induction by growth differentiation factor-5 in human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21165905>
- Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., Heath, J. K., & Tickle, C. (1995). Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90352-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90352-6)
- Cohn, M. J., Patel, K., Krumlauf, R., Wilkinson, D. G., Clarke, J. D. W., & Tickle, C. (1997). Hox9 genes and vertebrate limb specification. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/387097a0>
- Coleman, C. M., & Tuan, R. S. (2003). Functional role of growth/differentiation factor 5 in chondrogenesis of limb mesenchymal cells. *Mechanisms of Development*, *120*(7), 823–836. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00067-4)
- Cooke, J., & Summerbell, D. (1980). Cell cycle and experimental pattern duplication in the chick wing during embryonic development. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/287697a0>
- Cooper, K. L., Hu, J. K. H., Berge, D. Ten, Fernandez-Teran, M., Ros, M. A., & Tabin, C. J. (2011). Initiation of proximal-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science*, *332*(6033), 1083–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1199499>
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., & Martin, G. R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, *84*(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80999-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80999-X)
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L., & Yang, Y. (2005). Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental Cell*, *8*(5), 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.016>
- DeLise, A. M., Fischer, L., & Tuan, R. S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1053/joca.1999.0306>
- Deng, A., Zhang, H., Hu, M., Liu, S., Wang, Y., Gao, Q., & Guo, C. (2018). The inhibitory roles of ihh downregulation on chondrocyte growth and differentiation. *Experimental*

and Therapeutic Medicine. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5458>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317.

<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Duboc, V., & Logan, M. P. O. (2011a). Pitx1 is necessary for normal initiation of hindlimb outgrowth through regulation of Tbx4 expression and shapes hindlimb morphologies via targeted growth control. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.074153>

Duboc, V., & Logan, M. P. O. (2011b). Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology. In *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22582>

Eames, B. F., Sharpe, P. T., & Helms, J. A. (2004). Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Developmental Biology*.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.006>

Edom-Vovard, F., Bonnin, M. A., & Duprez, D. (2001). Fgf8 transcripts are located in tendons during embryonic chick limb development. *Mechanisms of Development*.

[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00483-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00483-X)

Edom-Vovard, F., & Duprez, D. (2004). Signals Regulating Tendon Formation during Chick Embryonic Development. In *Developmental Dynamics*.

<https://doi.org/10.1002/dvdy.10481>

Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M. A., Teillet, M. A., & Duprez, D. (2002). Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons.

Developmental Biology. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0707>

Elisa Piedra, M., Borja Rivero, F., Fernandez-Teran, M., & Ros, M. A. (2000). Pattern formation and regulation of gene expressions in chick recombinant limbs. *Mechanisms of Development*.

[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00247-6)

Erices, A., Conget, P., & Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>

Falcon, N. D., Riley, G. P., & Saeed, A. (2019). Induction of Tendon-Specific Markers in Adipose-Derived Stem Cells in Serum-Free Culture Conditions. *Tissue Engineering -*

Part C: Methods, 25(7), 389–400. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2019.0080>

Fallon, J. F., López, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B., & Simandl, B. K. (1994).

FGF-2: Apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.7908145>

Fernandez-Teran, M., Piedra, M. E., Kathiriya, I. S., Srivastava, D., Rodriguez-Rey, J. C., & Ros, M. A. (2000). Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: Implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development*, 127(10), 2133–2142. <https://doi.org/10.1242/dev.127.10.2133>

Fernandez-Teran, Marian, Piedra, M. E., Ros, M. A., & Fallon, J. F. (1999). The recombinant limb as a model for the study of limb patterning, and its application to muscle development. In *Cell and Tissue Research*.
<https://doi.org/10.1007/s004410051273>

Frederick, J. M., & Fallon, J. F. (1982). The proportion and distribution of polarizing zone cells causing morphogenetic inhibition when coaggregated with anterior half wing mesoderm in recombinant limbs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.

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 Proliferation*.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>

Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*.

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.

G., Z., Q., Z., F., E., E., M., Y., C., E., S., D., K., & B., L. (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Gamer, L. W., Ho, V., Cox, K., & Rosen, V. (2008). Expression and function of BMP3

- during chick limb development. *Developmental Dynamics*, 237(6), 1691–1698.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21561>
- Gañan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A., & Hurler, J. M. (1996). Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*.
- Gang, E. J., Jeong, J. A., Han, S., Yan, Q., Jeon, C. J., & Kim, H. (2006). In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. <https://doi.org/10.1080/14653240600735933>
- García-Lee, V., Díaz-Hernandez, M. E., & Chimal-Monroy, J. (2021). Inhibition of WNT/b-catenin is necessary and sufficient to induce scx expression in developing tendons of chicken limb. *International Journal of Developmental Biology*, 65(5–6), 395–401. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200166jc>
- Gavin, B. J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1990). Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.4.12b.2319>
- Geduspan, J. S., & MacCabe, J. A. (1987). The ectodermal control of mesodermal patterns of differentiation in the developing chick wing. *Developmental Biology*.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90492-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90492-1)
- Gluckman, E. . et al. (1989). Hematopoietic Reconstitution in a Patient with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from an HLA-Identical Sibling. *N Engl J Med*, 321, 1174–1178.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., & Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. In *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.20652>
- Goodwin, H. S., Bicknese, A. R., Chien, S. N., Bogucki, B. D., Oliver, D. A., Quinn, C. O., & Wall, D. A. (2001). Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: Expression of bone, fat, and neural markers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. <https://doi.org/10.1053/bbmt.2001.v7.pm11760145>
- Gros, J., & Tabin, C. J. (2014). Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1248228>
- Hall, B. K., & Miyake, T. (2000). All for one and one for all: Condensations and the

- initiation of skeletal development. In *BioEssays*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200002\)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4)
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050880104>
- He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood. *STEM CELLS*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0335>
- Herlofsen, S. R., Bryne, J. C., Høiby, T., Wang, L., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M. J., Boyle, P., Gu, H., Meza-Zepeda, L. A., Collas, P., Mikkelsen, T. S., & Brinchmann, J. E. (2013). Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-105>
- Hernandez-segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, *28*(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Hurle, J. M., Ros, M. A., Gañan, Y., Macias, D., Critchlow, M., & Hinchliffe, J. R. (1990). Experimental analysis of the role of ECM in the patterning of the distal tendons of the developing limb bud. *Cell Differentiation and Development*. [https://doi.org/10.1016/0922-3371\(90\)90078-B](https://doi.org/10.1016/0922-3371(90)90078-B)
- Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T., & Komori, T. (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Developmental Dynamics*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199904\)214:4<279::AID-AJA1>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4<279::AID-AJA1>3.0.CO;2-W)
- Ito, Y., Toriuchi, N., Yoshitaka, T., Ueno-Kudoh, H., Sato, T., Yokoyama, S., Nishida, K., Akimoto, T., Takahashi, M., Miyaki, S., & Asahara, H. (2010). The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000525107>
- Jacob, M., Christ, B., & Jacob, H. J. (1978). On the migration of myogenic stem cells into the prospective wing region of chick embryos. *Anatomy and Embryology*. <https://doi.org/10.1007/bf00343373>

- Javanshir, S., Younesi Soltani, F., Dowlati, G., Parham, A., & Naderi-Meshkin, H. (2020). Induction of tenogenic differentiation of equine adipose-derived mesenchymal stem cells by platelet-derived growth factor-BB and growth differentiation factor-6. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6855–6862. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05742-7>
- Kardon, G. (1998). Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development*.
- Karsenty, G., & Wagner, E. F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. In *Developmental Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00157-0)
- Kawakami, Y., Rodriguez-León, J., & Belmonte, J. C. I. (2006). The role of TGFβs and Sox9 during limb chondrogenesis. In *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.007>
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Kim, B. O., Tian, H., Prasongsukarn, K., Wu, J., Angoulvant, D., Wnendt, S., Muhs, A., Spitkovsky, D., & Li, R. K. (2005). Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: A preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIRCULATIONAHA.105.524678>
- Komori, T., Yagi, * H., Nomura, S., & Yamaguchi, A. (1998). Targeted disruption of. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8692–8697. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10711>
- Kuhlman, J., & Niswander, L. (1997). Limb deformity proteins: Role in mesodermal

induction of the apical ectodermal ridge. *Development*, 124(1), 133–139.

<https://doi.org/10.1242/dev.124.1.133>

LAJTHA, L. G. (1979). Stem Cell Concepts. *Differentiation*.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1979.tb01007.x>

Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, 79(6), 993–1003.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90030-2)

Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. Der, Hsieh, S. L., & Chen, T. H. (2004).

Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*.

<https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>

Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., & de Crombrughe, B. (1997).

SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.4.2336>

Lefebvre, Véronique. (2019). Roles and regulation of SOX transcription factors in

skeletogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*.

<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.007>

Lefebvre, Véronique, Li, P., & De Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-

Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO Journal*, 17(19), 5718–5733.

<https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5718>

Lewandoski, M., Sun, X., & Martin, G. R. (2000). Fgf8 signalling from the AER is

essential for normal limb development. *Nature Genetics*, 26(4), 460–463.

<https://doi.org/10.1038/82609>

Litingtung, Y., Li, Y., Fallon, J. F., & Chiang, C. (2002). Shh and Gli3 are dispensable for

limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*.

<https://doi.org/10.1038/nature01033>

Liu, C. F., Angelozzi, M., Haseeb, A., & Lefebvre, V. (2018). SOX9 is dispensable for the

initiation of epigenetic remodeling and the activation of marker genes at the onset of chondrogenesis. *Development (Cambridge)*, 145(14), 1–15.

<https://doi.org/10.1242/dev.164459>

- Logan, C., Hornbruch, A., Campbell, I., & Lumsden, A. (1997). The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development*.
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Choe, S., Garcia-Porrero, J. A., & Hurle, J. M. (2014). Ligand- and stage-dependent divergent functions of BMP signaling in the differentiation of embryonic skeletogenic progenitors in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(3), 735–748. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2077>
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Diaz-Mendoza, M. J., Garcia-Porrero, J. A., & Hurle, J. M. (2011). Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limb. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024546>
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A., & Hurle, J. M. (2010). Tgf2 and 3 are coexpressed with their extracellular regulator Ltbp1 in the early limb bud and modulate mesodermal outgrowth and BMP signaling in chicken embryos. *BMC Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-69>
- Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Martinez-Cue, C., Garcia-Porrero, J. A., & Hurle, J. M. (2009). Transforming growth factors β coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29988–29996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014811>
- MacCabe, J. A., Errick, J., & Saunders, J. W. (1974). Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(74\)80009-6](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(74)80009-6)
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.009>
- Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., Aglietta, M., Madon, E., & Fagioli, F. (2001). Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., & Martin, G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06876>

- Marín-Llera, J. C., & Chimal-Monroy, J. (2018). A small population of resident limb bud mesenchymal cells express few MSC-associated markers, but the expression of these markers is increased immediately after cell culture. *Cell Biology International*.
<https://doi.org/10.1002/cbin.10933>
- Marín-Llera, J. C., Garciadiego-Cázares, D., & Chimal-Monroy, J. (2019). Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms That Control Early Cell Fate Decisions During Appendicular Skeletogenesis. In *Frontiers in Genetics*.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00977>
- Martin, G. R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. In *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1571>
- Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Economides, A. N., Wang, X., Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K. T., Varona, P., & Hurle, J. M. (1999). Expression and function of gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9129>
- Merino, Ramón, Gañan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T., & Hurle, J. M. (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFβs, and noggin through BMP signaling. *Developmental Biology*, 200(1), 35–45.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8946>
- Meyer, M. B., Benkusky, N. A., & Pike, J. W. (2014). The RUNX2 cistrome in osteoblasts: Characterization, down-regulation following differentiation, and relationship to gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16016–16031.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552216>
- Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R., & Zuniga, A. (2004). Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*, 131(14), 3401–3410. <https://doi.org/10.1242/dev.01251>
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M., & Simonet, W. S. (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3156>
- Mirkes, P. E. (2008). Cell death in normal and abnormal development. *Congenital*

- Anomalies*, 48(1), 7–17. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2007.00175.x>
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Gañan, Y., Macias, D., & Hurle, J. M. (2008). Activin/TGF β and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.022>
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Sanchez-Fernandez, C., & Hurle, J. M. (2021). Cell death in the developing vertebrate limb: A locally regulated mechanism contributing to musculoskeletal tissue morphogenesis and differentiation. *Developmental Dynamics*, 250(9), 1236–1247. <https://doi.org/10.1002/dvdy.237>
- Moreau, C., Caldarelli, P., Rocancourt, D., Roussel, J., Denans, N., Pourquie, O., & Gros, J. (2019). Timed Collinear Activation of Hox Genes during Gastrulation Controls the Avian Forelimb Position. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.009>
- Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H., & De Crombrughe, B. (2003). Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1631288100>
- Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E. O., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P. L., Cheah, K. S. E., & Koopman, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, 183(1), 108–121. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8487>
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R., & Tickle, C. (1994). A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/371609a0>
- Nunes, V. A., Cavaçana, N., Canovas, M., Strauss, B. E., & Zatz, M. (2007). Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin in vitro only after exposure to in vivo muscle environment. *Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1042/bc20060075>
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., & Noji, S. (1997). The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*.

- Orfei, C. P., Viganò, M., Pearson, J. R., Colombini, A., De Luca, P., Ragni, E., Santos-Ruiz, L., & de Girolamo, L. (2019). In vitro induction of tendon-specific markers in tendon cells, adipose-and bone marrow-derived stem cells is dependent on TGFβ3, BMP-12 and ascorbic acid stimulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20010149>
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. In *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.990702>
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W. H., Beddington, R. S. P., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., & Owen, M. J. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89(5), 765–771. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80259-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80259-7)
- Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G., & McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development*.
- Pautou, M. P. (1973). Analyse de la morphogenèse du pied des oiseaux à l'aide de mélanges cellulaires interspécifiques. I. Etude morphologique. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 29(1), 175–196.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Pizette, S., Abate-shen, C., & Niswander, L. (2001). *BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb*. 4474, 1–12. [papers://34147092-be8b-4114-bd76-f22a3f34067a/Paper/p234](https://doi.org/10.1093/emboj/cda474)
- Pizette, S., & Niswander, L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*.
- Pizette, S., & Niswander, L. (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: Formation of prechondrogenic condensations and their differentiation

- into chondrocytes. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9610>
- Pryce, B. A., Watson, S. S., Murchison, N. D., Staverosky, J. A., Dünker, N., & Schweitzer, R. (2009). Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFB signaling are essential for tendon formation. *Development*, *136*(8), 1351–1361. <https://doi.org/10.1242/dev.027342>
- Rauch, A., Haakonsson, A. K., Madsen, J. G. S., Larsen, M., Forss, I., Madsen, M. R., Van Hauwaert, E. L., Wiwie, C., Jespersen, N. Z., Tencerova, M., Nielsen, R., Larsen, B. D., Röttger, R., Baumbach, J., Scheele, C., Kassem, M., & Mandrup, S. (2019). Osteogenesis depends on commissioning of a network of stem cell transcription factors that act as repressors of adipogenesis. *Nature Genetics*, *51*(4), 716–727. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0359-1>
- Rauch, A., & Mandrup, S. (2021). Transcriptional networks controlling stromal cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(7), 465–482. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00357-7>
- Reijntjes, S., Francis-West, P., & Mankoo, B. S. (2010). Retinoic acid is both necessary for and inhibits myogenic commitment and differentiation in the chick limb. *International Journal of Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082783sr>
- Ren, D., Tu, H. C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. D., & Cheng, E. H. Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science*, *330*(6009), 1390–1393. <https://doi.org/10.1126/science.1190217>
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M., & Tabin, C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT6a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90103-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90103-5)
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2)
- Robson, L. G., Kara, T., Crawley, A., & Tickle, C. (1994). Tissue and cellular patterning of the musculature in chick wings. *Development*.
- Ros, M. A., Rivero, F. B., Hinchliffe, J. R., & Hurler, J. M. (1995). Immunohistological and ultrastructural study of the developing tendons of the avian foot. *Anatomy and Embryology*. <https://doi.org/10.1007/BF00187179>

- Ros, Maria A., Lyons, G. E., Mackem, S., & Fallon, J. F. (1994). Recombinant limbs as a model to study homeobox gene regulation during limb development. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1296>
- Ros, Maria A., Piedra, M. E., Fallon, J. F., & Hurle, J. M. (1997). Morphogenetic potential of the chick leg interdigital mesoderm when diverted from the cell death program. *Developmental Dynamics*, 208(3), 406–419. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199703\)208:3<406::AID-AJA11>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<406::AID-AJA11>3.0.CO;2-Y)
- Roselló-Díez, A., Ros, M. A., & Torres, M. (2011a). Diffusible signals, not autonomous mechanisms, determine the main proximodistal limb subdivision. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1199489>
- Roselló-Díez, A., Ros, M. A., & Torres, M. (2011b). Diffusible signals, not autonomous mechanisms, determine the main proximodistal limb subdivision. *Science*, 332(6033), 1086–1088. <https://doi.org/10.1126/science.1199489>
- Rossi, G., & Messina, G. (2014). Comparative myogenesis in teleosts and mammals. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1604-5>
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N. J., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90621-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90621-V)
- Sacchetti, B., Funari, A., Remoli, C., Giannicola, G., Kogler, G., Liedtke, S., Cossu, G., Serafini, M., Sampaolesi, M., Tagliafico, E., Tenedini, E., Saggio, I., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2016). No identical “mesenchymal stem cells” at different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports*, 6(6), 897–913. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.011>
- Saunders, J W, & Gasseling, M. T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In *Epithelial-Mesenchymal interactions*.
- Saunders, John W. (1966). Death in embryonic systems. *Science*, 154(3749), 604–612. <https://doi.org/10.1126/science.154.3749.604>
- Savard, P., Gates, P. B., & Brockes, J. P. (1988). Position dependent expression of a homeobox gene transcript in relation to amphibian limb regeneration. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03325.x>

- Schweitzer, R., Chyung, J. H., Murtaugh, L. C., Brent, A. E., Rosen, V., Olson, E. N., Lassar, A., & Tabin, C. J. (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*.
- Schweizer, H., Johnson, R. L., & Brand-Saberi, B. (2004). Characterization of migration behavior of myogenic precursor cells in the limb bud with respect to Lmx1b expression. *Anatomy and Embryology*. <https://doi.org/10.1007/s00429-003-0373-y>
- Shapiro, I. M., Adams, C. S., Freeman, T., & Srinivas, V. (2005). Fate of the hypertrophic chondrocyte: Microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. In *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20057>
- Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., & Hiraki, Y. (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.036>
- Simon, H. G. (1999). T-box genes and the formation of vertebrate forelimb- and hindlimb specific pattern. *Cell and Tissue Research*, 296(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s004410051266>
- Slack, J. M. W. (2008). Origin of stem cells in organogenesis. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1162782>
- Smith, J. M., Jones, S. P., & White, L. D. (1977). Rapid Communication. *Gastroenterology*, 72(1), 193. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(77\)80340-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(77)80340-5)
- Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., & Vanhaecke, T. (2009). In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells into Hepatocytes: State of the Art. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0963>
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., & McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2072>
- Suemori, H., & Noguchi, S. (2000). Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9651>
- Tabin, C. J. (1989). Isolation of potential vertebrate limb-identity genes. *Development*.
- Takeda, S., Bonnamy, J. P., Owen, M. J., Ducky, P., & Karsenty, G. (2001). Continuous

- expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes and Development*, 15(4), 467–481. <https://doi.org/10.1101/gad.845101>
- Tavassoli, M., & Crosby, W. H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.161.3836.54>
- Tavella, S., Raffo, P., Tacchetti, C., Cancedda, R., & Castagnola, P. (1994). N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1352>
- Taylor, M. V. (2003). Muscle differentiation: signalling cell fusion. In *Current biology : CB*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.044>
- Tickle, C., Shellswell, G., Crawley, A., & Wolpert, L. (1976). Positional signalling by mouse limb polarising region in the chick wing bud. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/259396a0>
- Tickle, C., Summerbell, D., & Wolpert, L. (1975). Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/254199a0>
- Tickle, Cheryll. (2006). Making digit patterns in the vertebrate limb. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1830>
- Todt, W. L., & Fallon, J. F. (1984). Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.
- Todt, William L., & Fallon, J. F. (1986). Development of the apical ectodermal ridge in the chick leg bud and a comparison with the wing bud. *The Anatomical Record*. <https://doi.org/10.1002/ar.1092150312>
- Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X., Manner, P. A., Hozack, W. J., Danielson, K. G., Hall, D. J., & Tuan, R. S. (2003). Transforming Growth Factor- β -mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-cadherin and Mitogen-activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-talk. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305312200>
- Vandiedonck, C., & Knight, J. C. (2009). Europe PMC Funders Group THE HUMAN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX AS A. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 8(5), 379–394. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elp010>
- Weintraub, H., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Adam, M. A., Lassar, A. B., &

- Miller, A. D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5434>
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x>
- Wolpert, L. (2002). The progress zone model for specifying positional information. *International Journal of Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.12455622>
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P., & Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., & Tickle, C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development*.
- Yokoyama, H., Endo, T., Tamura, K., Yajima, H., & Ide, H. (1998). Multiple digit formation in *Xenopus* limb bud recombinants. *Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8856>
- Yokoyama, H., Tamura, K., & Ide, H. (2002). Anteroposterior axis formation in *Xenopus* limb bud recombinants: A model of pattern formation during limb regeneration. *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10155>
- Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R., & Lyons, K. M. (2005). *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500031102>
- Young, N. M. (2017). Integrating “evo” and “devo”: The limb as model structure. *Integrative and Comparative Biology*, 57(6), 1293–1302.
<https://doi.org/10.1093/icb/ix115>

- Zeller, R., López-Ríos, J., & Zuniga, A. (2009). Vertebrate limb bud development: Moving towards integrative analysis of organogenesis. In *Nature Reviews Genetics*.
<https://doi.org/10.1038/nrg2681>
- Zhang, G., Young, B. B., Ezura, Y., Favata, M., Soslowsky, L. J., Chakravarti, S., & Birk, D. E. (2005). Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. In *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., & De Crombrughe, B. (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental Dynamics*, 209(4), 377–386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199708\)209:4<377::AID-AJA5>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199708)209:4<377::AID-AJA5>3.0.CO;2-F)
- Zúñiga, A., Haramis, A. P. G., McMahon, A. P., & Zeller, R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*, 401(6753), 598–602. <https://doi.org/10.1038/44157>
- Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Torre-Perez, N., Garcia-Porrero, J. A., & Hurler, J. M. (2007). Cathepsin D gene expression outlines the areas of physiological cell death during embryonic development. *Developmental Dynamics*, 236(3), 880–885.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21076>
- Zuzarte-Luis, Vanessa, Montero, J. A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J. C., & Hurler, J. M. (2007). Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Developmental Biology*, 301(1), 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.008>
- Zwilling, E. (1956). Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axis establishment. *Journal of Experimental Zoology*.
<https://doi.org/10.1002/jez.1401320110>

XVI. ANEXOS

ANEXO I. Soluciones usadas.

1. PBS 1X

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
Agua DB	800 ml
Ajustar pH a 7.4, aforar a 1 L, y esterilizar	

2. TCA 5%

TCA	5 g
Agua MilliQ	100 ml

3. Alcohol Ácido

Etanol 70%	99 ml
HCl	1 ml
Agregar el HCl al etanol, guardar a TA	

4. Azul Alciano 1%

Alcohol Ácido	80 ml
Azul Alciano	1 g
Aforar a 100 ml con Alcohol Ácido; guardar a TA	

5. PFA 4%

Paraformaldehído	4 g
NaOH 10N	0.6 μ l
PBS 10X	10 ml
Aforar a 1 L con agua DB, y filtrar	

6. Solución 1 Bencilicos

Bencil benzoato	60 ml
Bencil benzol	30 ml
Guardar en oscuridad a TA	

7. Solución II Bencílicos

Metanol Absoluto	50 ml
Solución I Bencílicos	50 ml
Guardar en oscuridad a TA	

8. TBE

Tris Base	10.8 g
Ácido Bórico	5.5 g
EDTA 0.5M	4 ml
Agua MilliQ	Aforar a 1 L

9. Grenetina al 5%

Grenetina en Polvo	2.5 g
Cr ₂ (SO ₄) ₃	0.125 g
Disolver en agua DB a 60°C	
Aforar a 500 ml	

10. Sulfato de Cobre 1mM en Acetato de Amonio

CuSO ₄	1mM
C ₂ H ₇ NO ₂	50mM, pH5
Preparar al momento	

11. Buffer de Hibridación

50% Formamida	5 ml (100% stock)
5X SSC	2.5 ml (20X stock)
SDS 1%	1 ml (10% stock)
50 µg/ml tRNA	50 µl (10mg/ml stock)
50 µg/ml heparina (pH 4.5)	10 µl (50mg/ml stock)

12. Solución I (ISH)

Formamida	20 ml
SSC 20X pH 4.5	8 ml
SDS 10%	4 ml
Agua MilliQ	8 ml

13. Solución III (ISH)

Formamida	20 ml
SSC 20X pH 4.5	4 ml
Agua MilliQ	16 ml

14. TBST

	STOCK	Para 100 ml
50 mM TrisHCl pH 7.5	1 M	5 ml
150 mM NaCl	5 M	3 ml
Tween-20	10 %	1 ml
KCl	1 M	0.25 ml
Agua MilliQ	-	90.75 ml
Levamisol	200 mM	0.5 ml

15. Levamisole/TBST

TBST	99 ml
Levamisol 2mM	1 ml

16. NTMT 1 mL Levamisole

	STOCK	Para 100 ml
Tris HCl pH 9.5	1 M	10 ml
MgCl ₂	1 M	5 ml
NaCl	5 M	2 ml
Tween-20	10%	0.4 ml
Agua MilliQ	-	82.4 ml
Levamisole	200 mM	0.5 ml

ANEXO II. Oligonucleótidos para qRT-PCR

GEN	Secuencia (5' a 3')
<i>huMHC</i>	Fw: AGGACGGTTCTCACACCATC Rv: GATGTAATCCTTGCCGTCGT
<i>huEF-1a</i>	Fw: AGATTGATCGCCGTTCTGGT Rv: CAGCAAAGCGACCCAAAGG
<i>huGDF5</i>	Fw: TCCAGACCCTGATGAACTCC Rv: TCCACGACCATGTCCTCATA
<i>huITGB1</i>	Fw: TGTCTGTGTCAAAGCGAAGG Rv: ACATCTGCATGCACCACATT
<i>huSox9</i>	Fw: AACAAAGCCACACGTCAAGC Rv: TCTTCTCGCTCTCGTTCAGC
<i>huCol2a1</i>	Fw: TCCAGATGACCTTCCTACGC Rv: AGCTGCTTCGTCCAGATAGG
<i>huAgre</i>	Fw: CAAGTGGTTCCTGGTGTGG Rv: GCTCGGTGGTGA ACTCTAGG
<i>huTnmd</i>	Fw: TCCTCTGGCATCTGTTAGCC Rv: TTGCCATGGTCTCTCAGC
<i>huMhw</i>	Fw: CGTATTGGAAGGAGATCAACG Rv: GGACGACTTCTGGATGATGC
<i>huScx</i>	Fw: GCACCAACAGCGTGAACA Rv: GGTGCGAGATGTAGCTGGAG
<i>huHif1a</i>	Fw: GAAGGTATTGCACTGCACAGG Rv: AGCACCAAGCAGGTCATAGG
<i>huRunx2</i>	Fw: TTCTCCAACCCACGAATGCA Rv: GGTGTGGTAGTGAGTGGTGG

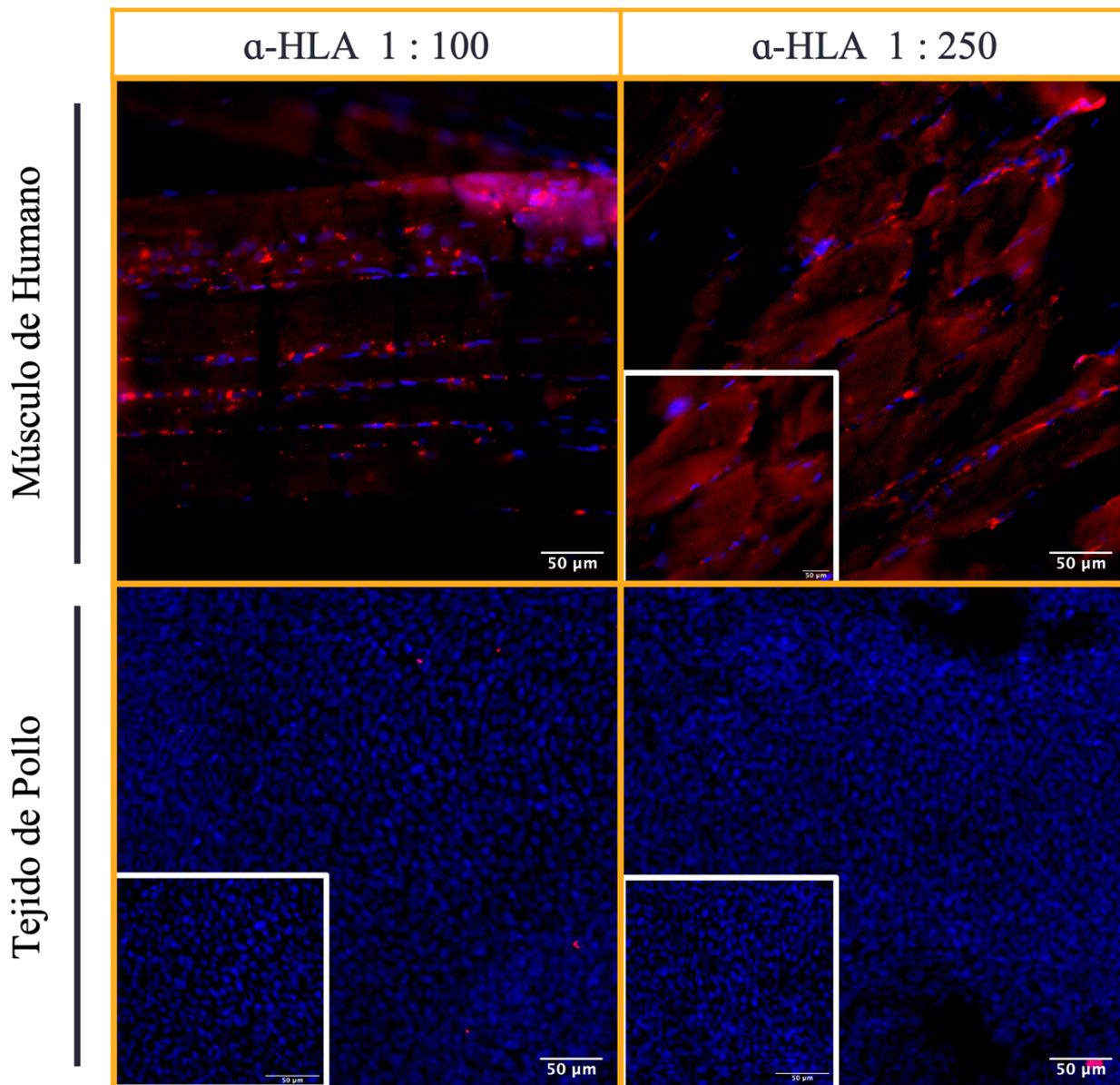
ANEXO III. Anticuerpos primarios y secundarios usados

Anticuerpo	Marca	No. Catálogo	Dilución Usada
ANTICUERPOS PRIMARIOS			
α -HLA Host: Ratón	Abcam	Ab70328	1:250
α -Caspasa 3 activa Host: Conejo	Promega	G748A	1:250
α -SOX9 Host: Conejo	Millipore	AB5535	1:250
α -SCX Host: Conejo	Abcam	Ab58655	1:250
ANTICUERPO SECUNDARIO			
α -IgG Conejo Conjugado a Cy3 Host: Cabra	Jackson ImmunoResearch	111-165-144	1:250
α -IgG Ratón Conjugado AF-555	-	-	1:250

ANEXO IV. Condiciones Hibridación *in situ*

Sonda	Proteinasa K	Temp. De Hibridación
ck – <i>Fgf8</i>	15 μ g/ml, 20 min, 20°C	67.5°C

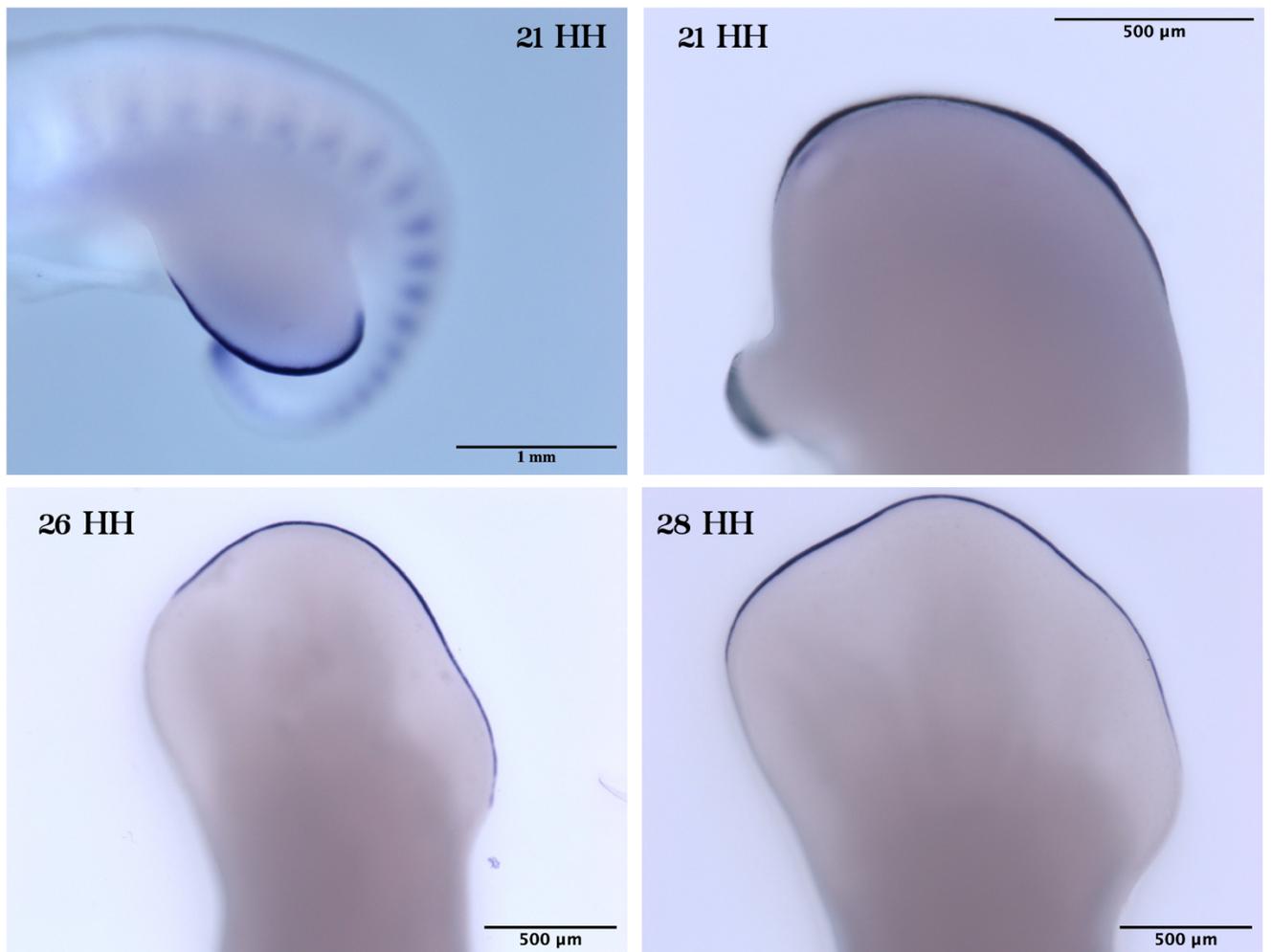
ANEXO V. Titulación del anticuerpo HLA en músculo de humano



Anexo V. Titulación del Anticuerpo α -HLA en tejido de humano y pollo. Se muestran imágenes representativas de las inmunofluorescencias usando dos concentraciones del anticuerpo primario α -HLA, mostrando un marcaje exclusivamente en las células de humano. Los recuadros blancos muestran un aumento óptico de la figura correspondiente. En azul se marcan los núcleos celulares, y en rojo la proteína HLA.

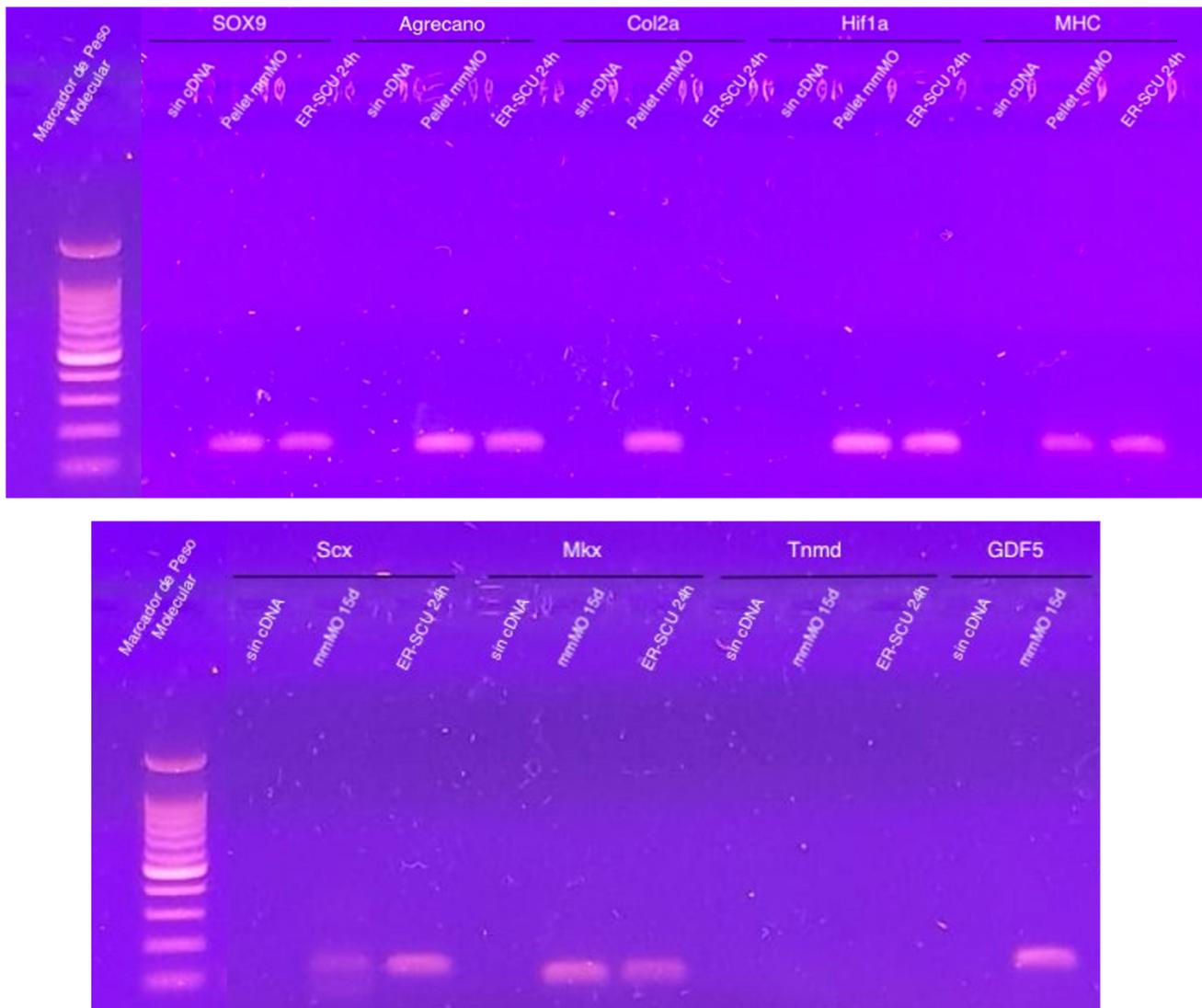
ANEXO VI. Prueba de Sonda *Fgf8* para Hibridación *in situ*

ISH *Fgf8*



Anexo VI. Prueba de Sonda *Fgf8* para Hibridación *in situ*. Para corroborar la sonda transcrita de *Fgf8*, se realizó una prueba con embriones de pollo de diferente etapa. Se muestran imágenes obtenidas de los embriones etapa 21HH, 26HH y 28HH. En morado se marca la expresión de *Fgf8*

ANEXO VII. Prueba de Oligonucleótidos en RNA de Humano



Anexo VII. Prueba de Oligonucleótidos diseñados. Para analizar la funcionalidad de los oligos diseñados *in silico*, se realizó una RT-qPCR con RNA de MSC de Médula Ósea cultivadas en Pellet, con medio condrogénico (adicionado con TGF- β) por 15 días. Se muestra un gel con los productos amplificados.