



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DE REGULACIÓN
EPIGENÉTICA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MULTILINAJE
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES BOVINAS**

Fabrizio Hernán Cuevas Contreras

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: Oscar Peralta Troncoso.
Universidad de Chile

FONDECYT 11100205

SANTIAGO, CHILE
2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DE REGULACIÓN
EPIGENÉTICA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MULTILINAJE
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES BOVINAS**

Fabrizio Hernán Cuevas Contreras

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

Nota Final:

Nota: Firma:

Profesor Guía:	Óscar Peralta T.
Profesor Consejero:	Mónica de Los Reyes S.
Profesor consejero:	José Ignacio Arias F.

FONDECYT 11100205

SANTIAGO, CHILE
2014

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MULTILINAJE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES BOVINAS

FABRIZIO H. CUEVAS CONTRERAS*

*Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

RESUMEN

La regulación epigenética es un proceso clave en la expresión génica, participando en silenciamiento y activación de genes durante la diferenciación multilinjaje de células madre mesenquimales (CMM). El objetivo del presente estudio fue cuantificar la expresión de enzimas de metilación del ADN (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B), metilación de histonas (EZH2) y demetilación de histonas (KDM6A) en CMM fetales bovinas durante la diferenciación *in vitro* osteogénica, condrogénica y adipogénica. Las CMM fueron aisladas desde médula ósea de fetos bovinos (7-9 meses de gestación, n=3) y cultivadas en presencia de factores de diferenciación. La expresión génica fue cuantificada mediante PCR cuantitativo (Q-PCR). En la diferenciación osteogénica, se detectó al día 24 un aumento ($P<0,05$) en la expresión de KDM6A comparado al día 0. La expresión de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 y KDM6A fue menor ($P<0,05$) en CMM diferenciadas el día 7 de cultivo condrogénico en relación al día 0 y al control. Se detectó una disminución ($P<0,05$) en la expresión de DNMT1 en CMM diferenciadas al día 6 de cultivo adipogénico comparado al día 0. Adicionalmente, durante este cultivo se detectó un aumento ($P<0,05$) en la expresión de DNMT3A, DNMT3A y EZH2 en CMM diferenciadas los días 12 y 18 de diferenciación, en comparación al día 0. En conclusión, se detectó un aumento de KDM6 durante la diferenciación osteogénica, y un aumento de todas las enzimas evaluadas durante la diferenciación adipogénica. En contraste, no se detectó aumento de enzimas durante la diferenciación condrogénica.

Palabras Clave: Células madre mesenquimales, Diferenciación multilinjaje, Expresión de enzimas epigenéticas.

EVALUATION OF EPIGENETIC ENZYME EXPRESSION DURING MULTILINEAGE DIFFERENTIATION OF BOVINE MESENCHYMAL STEM CELLS

FABRIZIO H. CUEVAS CONTRERAS*

*Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

ABSTRACT

Epigenetic regulation is a key process that control gene expression and participate in gene silencing and activation during the multilineage differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). The aim of this study was to quantify the expression of enzymes involved in DNA methylation (DNMT1, DNMT3A and DNMT3B), histone methylation (EZH2) and histone demethylation (KDM6A) in bovine fetal MSCs during osteogenic, chondrogenic and adipogenic *in vitro* differentiation. MSCs were isolated from bone marrow of bovine fetuses (7-9 months pregnant, n=3) and induced toward multilineage differentiation using *in vitro* culture system. Relative gene expression was evaluated using quantitative PCR (Q-PCR). During osteogenic differentiation KDM6A mRNA levels were higher ($P < 0.05$) on day 24 compared to Day 0. Relative expression of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 and KDM6A was lower ($P < 0.05$) on Day 7 of chondrogenic differentiation compared to day 0 and control. A decreased ($P < 0.05$) in the expression of DNMT1 was detected in differentiated MSCs at Day 6 of adipogenic culture compared to Day 0. Additionally, during this culture and increased ($P < 0.05$) in the expression of DNMT3A, DNMT3B and EZH2 was detected in differentiated MSCs at days 12 and 18 of culture compared to Day 0. In conclusion, KDM6 was up-regulated during osteogenic differentiation, and increased for all tested enzymes adipogenic differentiation was detected. In contrast, no increase of enzyme was detected during chondrogenic differentiation.

Key Words: Mesenchymal stem cells, Multilineage differentiation, Epigenetic enzyme expression.

1. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (CMM) fueron caracterizadas inicialmente como células de morfología fibroblastoide con capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Friedenstein *et al.*, 1970). Posteriormente se estableció que las CMM eran células progenitoras multipotentes con capacidad ilimitada de autorrenovación y potencial para generar progenie del tipo celular musculo-esquelético (Caplan, 1991). Recientemente, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha propuesto tres criterios para la clasificación de CMM humanas: 1) adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar, 2) expresión de marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90 y ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético CD34, CD45 y CD19, y 3) capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica bajo condiciones de cultivo estándar *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Las CMM han sido tradicionalmente caracterizadas como una población celular presente en medula ósea, conformando una proporción celular que corresponde al 0,001% a 0,01% del total de las células nucleadas. En la medula ósea, las CMM cumplen la función de regenerar tejidos mesenquimales como cartílago, hueso, ligamentos y estroma (Pittenger *et al.*, 1999). Sin embargo, las CMM se encuentran en otros tejidos adultos y han sido aisladas desde tejido adiposo, líquido amniótico, periostio, encéfalo, hígado, músculo esquelético y folículo piloso (Rastegar *et al.*, 2010). La función de las CMM en estos órganos es reemplazar células y regenerar tejidos. Según su tejido de origen se han reportado diferencias menores en cuanto al potencial de diferenciación y patrón de expresión de antígenos de membrana (Horwitz *et al.*, 2005; Rastegar *et al.*, 2010).

Se ha reportado ampliamente que las CMM poseen potencial de autorrenovación y capacidad multipotente (Rastegar *et al.*, 2010). El potencial de autorrenovación se refiere a los mecanismos biológicos por los cuales una célula madre preserva el estado indiferenciado en la progenie (Horwitz *et al.*, 2005; Rastegar *et al.*, 2010). La multipotencialidad en cambio se refiere a la propiedad de diferenciación hacia linajes celulares específicos, la cual se ha estudiado *in vitro* principalmente en líneas mesodérmicas que incluyen las osteogénica, condrogénica y adipogénica (Pittenger *et al.*,

1999). Estas características, además de la factibilidad de aislamiento y cultivo, han abierto la posibilidad de utilizar estas células en los ámbitos de la medicina regenerativa y la terapia génica con el fin de desarrollar tratamiento para trastornos degenerativos, isquémicos y autoinmunes (Rastegar *et al.*, 2010).

1.1 Diferenciación Multilínea de CMM

Los factores comúnmente utilizados para la inducción de diferenciación osteogénica *in vitro* son la Dexametasona, el Ácido ascórbico y el β -glicerofosfato (Pittenger *et al.*, 1999; Coehlo y Fernandes, 2000). La Dexametasona actúa mediante la fosforilación de RunX2, factor que permite la expresión de proteínas específicas del linaje osteogénico (Phillips *et al.*, 2006). Por otro lado el Ácido ascórbico aumenta la producción de matriz extracelular rica en colágeno (Choi *et al.*, 2008) y el β -glicerofosfato favorece su mineralización actuando como sustrato de fosfato para la producción de hidroxiapatita (Chung *et al.*, 1992). Por su parte, la inducción del proceso de diferenciación condrogénica *in vitro* se ha visto favorecida con la adición de factores como el Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1), Dexametasona, solución ITS (Insulina, Transferrina y Ácido selénico), Piruvato y Ascorbato 2-fosfato (Derfoul *et al.*, 2006). Para este tipo de diferenciación se utiliza una alta densidad celular mediante cultivo en pellet o micromasa (Eslaminejad *et al.*, 2006). Este tipo de cultivo permite la formación de uniones intercelulares que conducen a la agregación celular y facilitan el proceso de diferenciación (Tuli *et al.*, 2003). El TGF- β 1 induce agregación celular y estimula la diferenciación, promoviendo el depósito de proteoglicanos (Tapp *et al.*, 2008) estimulando la isoforma activa del receptor de glucocorticoides GR- α . Además, el TGF- β 1 actúa sinérgicamente con la Dexametasona, regulando en forma positiva la expresión de genes de matriz extra celular (Derfoul *et al.*, 2006). En el caso de la diferenciación adipogénica *in vitro*, se utilizan factores inductores como Dexametasona, Insulina, Indometacina y 3- Isobutilmetilxantina (Pittenger *et al.*, 1999). La Dexametasona induce la expresión de la proteína aP2, proteína específica del tejido adiposo (Sun *et al.*, 2003). Sin embargo ésta debe actuar sinérgicamente con otras moléculas como la Fosfodiesterasa Isobutilmetilxantina e Insulina para inducir la expresión de otros genes específicos del linaje adipogénico (Teruel *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2003). Por

su parte, la Indometacina estimula la expresión de PPAR- γ , cuya función es regular el proceso de diferenciación adipogénica (Lehmann *et al.*, 1997).

El proceso de diferenciación celular comprende el silenciamiento de genes de pluripotencia y la activación de genes de linaje específico (Collas *et al.*, 2008). En términos generales, la activación génica se produce mediante la transcripción del material genético presente en el genoma hacia ARN mensajero (ARNm) y la traducción de éste hacia proteína (Bird, 2007). Dentro del proceso de diferenciación celular, la expresión génica puede ser regulada ya sea a nivel de transcripción, post transcripción, traducción y post traducción (Teven *et al.*, 2011). Sin embargo, existen mecanismos adicionales de regulación conocidos como regulación epigenética, que no están asociados a una secuencia nucleotídica sino que dependen de la conformación y estado químico del genoma celular (Bird, 2007).

1.2 Mecanismos de Regulación Epigenética

La regulación epigenética comprende cambios estructurales en la cromatina que permiten registrar, señalar o perpetuar estados de mayor o menor actividad en las distintas regiones cromosómicas (Jaenisch y Bird, 2003; Bird, 2007). Recientemente, una gran cantidad de estudios han destacado la importancia de los mecanismos de regulación epigenética como un importante modulador del potencial de diferenciación (Collas, 2010). Durante el proceso de diferenciación celular, la regulación epigenética participa en el control de la expresión secuencial de factores de transcripción, los que a su vez inducen el progresivo silenciamiento de los genes responsables de la pluripotencia y la coordinada activación de los genes específicos de cada linaje celular (Lunyak y Rosenfeld, 2008). Los mecanismos de regulación epigenética descritos incluyen inicialmente a la metilación del ADN, la cual modifica el patrón de lectura del material genético (Jaenisch y Bird, 2003). Por otra parte la modificación de las histonas altera la estructura de la cromatina y con ello su accesibilidad a otros factores reguladores de la expresión génica (Kouzarides, 2007).

La metilación del ADN corresponde a una modificación post-transcripcional que involucra la unión covalente de un grupo metil al carbono 5 de la base nitrogenada citosina dentro del dinucleótido Citosina-Fosfato-Guanina (CpG) (Jaenisch y Bird, 2003). El dinucleótido CpG

se encuentra presente a lo largo del material genético, concentrándose en secuencias llamados islas CpG, las que a su vez se encuentran generalmente cercanos a un promotor (Takai y Jones, 2003). Si estas regiones se encuentran hipermetiladas, este estado interfiere con la replicación directamente mediante la interrupción de otros factores de transcripción, o de manera indirecta mediante la unión de otros factores represores que reconocen la metilación en CpG y permiten el silenciamiento de la transcripción del gen (Kass *et al.*, 1997). La metilación del ADN es catalizada por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMT) (Turek-Plewa y Jagodzinski, 2005). Dentro de estas enzimas se ha descrito la DNMT1 que es responsable de metilar las hebras hemimetiladas luego de la replicación y división celular, asegurando la heredabilidad y mantención del patrón de metilación (Bestor, 2000; Jaenisch y Bird, 2003). Por su parte, las enzimas DNMT3A y DNMT3B se encargan de la metilación *de novo* de la doble hebra de ADN durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (Turek-Plewa y Jagodzinski, 2005). Los estudios realizados en células madre embrionarias (CME), germinales y somáticas de ratón y humano sometidas a diferenciación a través de privación de factores extracelulares facilitadores de pluripotencia, sugieren que los procesos de metilación del ADN regulan la duración del proceso de diferenciación y la mantención del tipo celular una vez que estas células se han diferenciado (Lunyak y Rosenfeld, 2008). Además se ha descrito que éstas enzimas son multifuncionales debido a que además de catalizar la metilación, activan otros cambios tendientes a la remodelación de la cromatina (Turek-Plewa y Jagodzinski, 2005).

Otro mecanismo de regulación epigenética corresponde a la modificación de histonas, que consiste en la unión covalente de un grupo químico en el extremo N terminal de la estructura proteica (Kouzarides, 2007). Este proceso produce cambios que conllevan una mayor o menor condensación del material genético y por lo tanto una accesibilidad variable de los factores de transcripción en las diferentes regiones del genoma (Teven *et al.*, 2011). Éstas modificaciones se basan en dos mecanismos de descondensación de la cromatina; ya sea a través de la interrupción de las interacciones entre histonas o bien mediante el reclutamiento de otras proteínas (Kouzarides, 2007). Uno de los mecanismos mayormente estudiados corresponde a la metilación de histonas, la cual consiste en la adición de un grupo metil al aminoácido lisina o arginina (Zhang y Reinberg, 2001). Esta unión, dependiendo del sitio y aminoácido metilado puede activar o reprimir la transcripción

(Teven *et al.*, 2011). Por ejemplo, la acción de la enzima EZH2 provoca la trimetilación de la lisina 27 de la histona tres (H3K27) la cual recluta el complejo PolyComb asociado a su vez a la represión de la expresión génica (Schwartz y Pirrotta, 2007). La acción de este complejo ha sido vinculada a la mantención del estado pluripotente de CME, mediante la represión de genes involucrados en su diferenciación (Gil *et al.*, 2005; Sauvageau y Sauvageau, 2008). Sin embargo el proceso de metilación de histonas puede ser revertido, mediante la acción de enzimas demetilantes (Kouzarides, 2007). Por lo tanto, la acción antagónica de ambos grupos de enzimas genera un balance entre metilación y demetilación de histonas que permite regular el estado de la cromatina durante los procesos de diferenciación (Eslaminejad *et al.*, 2013). Al respecto, la enzima KDM6A demetila la trimetilación H3K27 (Agger *et al.*, 2007) contraponiendo la acción de EZH2 y promoviendo la diferenciación celular (Lunyak y Rosenfeld, 2008). De esta manera, mediante el equilibrio entre metilación y demetilación de histonas, sumado a los patrones de metilación del ADN, se activan los genes correspondientes a cada linaje celular mediando la diferenciación.

1.3 Regulación Epigenética durante la Diferenciación Celular

La diferenciación *in vitro* de CMM hacia el linaje osteogénico, es controlada por una compleja red de interacciones entre factores de transcripción. Entre estos factores se ha identificado al factor RUNX2 como el principal regulador de este proceso al mediar la expresión de genes marcadores de linaje osteogénico como Osteocalcina (OC) (Komori, 2006). Así, se ha descrito la hipermetilación de la zona codificante de OC en células indiferenciadas de rata, la cual va progresivamente demetilándose conforme avanza la diferenciación (Villagra *et al.*, 2002). Por el contrario durante la diferenciación osteogénica descrita en CMM de humano, se promueve la metilación de genes represores de este proceso como *BRACHYURI* y *TRIP10* (Teven *et al.*, 2011). Asimismo durante este proceso, se ha detectado una disminución de la actividad de la enzima EZH2 involucrada en la mantención del estado indiferenciado en CMM humanas (Wei *et al.*, 2010).

Durante la diferenciación condrogénica de CMM humanas predomina la hipometilación de regiones cercanas a promotores de genes específicos de tejido cartilaginoso. Esto permite una descondensación de la cromatina en las regiones codificantes del gen *SOX-9*, el cual regula la expresión de proteínas específicas de cartílago como AGGRECAN (ACAN) (Eslaminejad *et al.*, 2013). Sin embargo, el proceso de diferenciación condrogénica se explica en mayor medida por cambios producidos en histonas que por el patrón de metilación del ADN. Dentro de estos últimos, tienen gran importancia las metilaciones en el sitio H3K4 y las trimetilaciones en H3K36 y H3K4 (Herlofsen *et al.*, 2013).

En el caso de la diferenciación adipogénica, se ha descrito en CMM humanas que el proceso inicia con una primera etapa de determinación, en la cual son silenciados los genes de otros linajes mediante metilación del ADN (Rosen y MacDougald, 2006). En una segunda etapa de diferenciación, son demetiladas las regiones codificantes de genes cruciales en la diferenciación hacia linaje adipogénico (Teven *et al.*, 2011). Además existen cambios en la estructura de la cromatina, en particular la adición de un grupo metil al sitio H3K4, reacción que ocurre de igual forma que en la diferenciación condrogénica pero favoreciendo la expresión de genes adipo- específicos como PPAR λ 2 (Li *et al.*, 2010). Así, se describe a los mecanismos de regulación epigenética como un factor crucial durante la diferenciación celular, por lo que su evaluación es fundamental con el fin de optimizar este proceso.

Dada la importancia del mecanismo de control epigenético durante el proceso de diferenciación celular, en el presente proyecto de memoria de título se propuso evaluar la expresión de las enzimas de regulación epigenética ADN metiltransferasas DNMT1, DNMT3A Y DNMT3B, de la enzima metilante de histonas EZH2 y de la enzima demetilante de histonas KDM6A en CMM bovinas fetales durante los procesos de diferenciación *in vitro* osteogénico, condrogénico y adipogénico.

HIPÓTESIS

El proceso de diferenciación de CMM derivadas de médula ósea fetal bovina hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico está asociado a una disminución en la expresión de enzimas involucradas en los procesos de metilación de ADN e histonas y a un aumento en la expresión de enzimas de demetilación de histonas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de las enzimas asociadas a la regulación epigenética DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 y KDM6A en células madre mesenquimales (CMM) bovinas fetales durante los procesos *in vitro* de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los niveles de expresión de enzimas asociadas a la metilación del ADN DNMT1, DNMT3A y DNMT3B en CMM bovinas fetales durante los procesos de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.
2. Cuantificar el nivel de expresión de la enzima asociada a la metilación de histonas EZH2 en CMM bovinas fetales durante los procesos de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.
3. Cuantificar el nivel de expresión de la enzima asociada a la demetilación de histonas KDM6A en CMM bovinas fetales durante los procesos de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención y cultivo de CMM

Los experimentos realizados en el presente estudio han sido aprobados por el comité asesor de bioética del Fondo de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT). Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio del Proyecto FONDECYT11100205 del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las muestras de médula ósea fueron obtenidas desde fetos bovinos muertos de 7 a 9 meses de gestación, obtenidos desde una planta faenadora local. Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico al laboratorio y los fémures fetales fueron separados de tejidos blandos y seccionados en la diáfisis utilizando una sierra. La medula ósea fue aspirada mediante una bránula de 18 G conectada a una jeringa de 10 ml conteniendo medio de recolección consistente en DMEM alto en glucosa (#SH30002.02; “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, Thermo Scientific, Utah, USA) suplementado con 1000 UI de Heparina, 100 µg/mL de Estreptomicina y 100 UI/mL de Penicilina (#SV30010; Thermo Scientific, Utah, USA). El aspirado de medula ósea fue centrifugado (Clay-Adams, NY, USA) dos veces en Buffer Fosfato Salino (PBS; pH 7,4) y dos veces en medio de recolección sin Heparina a 500 G por 5 min. Una vez lavado, el pellet fue aspirado y suspendido en medio de expansión (DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (#SH30559.03; SFB, Hyclone, Utah, USA), 100 µg/mL de Estreptomicina y 100 UI/mL de Penicilina) para su posterior siembra en frasco de cultivo de 25 mL (T75, Falcon, NJ, USA) a 38,5 °C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ (Shel Lab, OR, USA). Luego de 2 días de cultivo, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio fresco y lavado 2 veces con PBS. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia, se realizaron pasajes de células mediante remoción con 0,25% de Tripsina/EDTA por 5 min. Las CMM fueron cultivadas en medio de expansión hasta obtener suficiente cantidad de células para los experimentos específicos.

2.2 Diferenciación Osteogénica

Las CMM fueron cultivadas por 21 días bajo condiciones de diferenciación osteogénica siguiendo un protocolo previamente reportado (Bosnakovski *et al.*, 2005). Entre 400 y 600 x 10⁵ células fueron sembradas en placas de cultivo de 25 cm² conteniendo medio de cultivo de expansión (control) o de diferenciación. El medio de diferenciación osteogénica consistió en DMEM alto en glucosa (Thermo Scientific, Utah, USA) suplementado con 10% de SFB (Hyclone, Utah, USA), Dexametasona (100 nM), β-glicerofosfato (10 mM), Penicilina/Estreptomina (100 UI/mL y 100 μg/mL), Anfotericina (2,5 μg/mL), y Ácido Ascórbico (0,05 mM). Las CMM fueron cultivadas por 21 días a 38°C con 5% de CO₂, bajo un ambiente humedecido. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 48 horas y las muestras de cultivos celulares se obtuvieron los días 0, 8, 16 y 24 de cultivo. Las muestras fueron fijadas en 500 μL de buffer RLT (Qiagen, CA, USA) y 5 μL de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para posterior análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativo (Q-PCR).

2.3 Tinción de Von Kossa

Luego de 24 días de cultivo bajo condiciones osteogénicas o control, las CMM bovinas fetales fueron sometidas a tinción utilizando reactivo de Von Kossa para determinar la presencia de depósitos de minerales. Las células se sometieron a una fijación con Paraformaldehído al 4% y posteriormente se conservaron a 4°C hasta su análisis. La tinción se realizó posterior a un lavado con agua destilada, incubando las células durante 10 minutos en una solución al 2% de nitrato de plata (AgNO₃) en oscuridad. Posteriormente las CMM se sometieron a la luz directa por 15 minutos y se registraron los cambios morfológicos mediante microscopio de campo claro conectado a una cámara de fotomicroscopía (Olympus, Tokyo, Japón).

2.4 Diferenciación Condrogénica

Las CMM fueron cultivadas por 21 días bajo condiciones de diferenciación condrogénica siguiendo un protocolo previamente reportado (Bosnakovski *et al.*, 2004). Se sembró un total de 1×10^6 células en placas de cultivo de 25 cm² conteniendo medio de cultivo de expansión (control) o de diferenciación condrogénica. El medio de diferenciación condrogénica consistió en DMEM alto en glucosa (Thermo Scientific, Utah, USA), suplementado con 10% de solución ITS (6.25ug/mL de Insulina, 6.25ug/mL de Transferrina, 6.25ug/mL de Acido Selénico; B&D Biosciences, USA), Piruvato de Sodio 1mM (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 50ug/mL de Ascorbato 2-Fosfato (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Dexametasona 0.1uM (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 8ng/mL de TGF- β 1 (R&D Systems, MN, USA), 100ug/mL de Estreptomicina, 100U/ de Penicilina y 0.25ug/mL de Anfotericina B. Los tubos fueron centrifugados a 550g por 5 minutos para generar un pellet de alta densidad. Las células se cultivaron por 21 días en atmósfera humidificada a 38°C, con 5% de CO₂. Se obtuvieron muestras de cultivos celulares los días 0, 7, 14 y 21 y se fijaron en 500 μ L de buffer RLT (Qiagen, CA, USA) y 5 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para posterior análisis de expresión génica mediante Q-PCR.

2.5 Tinción Azul de Alcian

Las CMM bovinas fetales sometidas a diferenciación condrogénica fueron teñidas utilizando reactivo de Azul de Alcian 0,5% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para detectar la presencia de Glicosaminoglicanos sulfatados. El pellet resultante después de 21 de diferenciación fue fijado en Paraformalina al 2% por 2 horas y luego conservado en PBS a 4°C. Los pellets fueron embebidos en parafina y cortados en secciones de 5 μ m. Los cortes fueron incubados en portaobjetos durante la noche a 37°C y posteriormente las secciones fueron desparafinadas mediante lavados en xilol y rehidratadas por inmersión en gradientes de alcohol. Luego los cortes fueron incubados por 10 minutos en Azul de Alcian al 0.5% y observados bajo microscopio óptico.

2.6 Diferenciación Adipogénica

Las CMM fueron cultivadas por 18 días bajo condiciones de diferenciación adipogénica siguiendo un protocolo previamente reportado (Bosnakovski *et al.*, 2005). Las CMM fueron cultivadas a densidades de $2-5 \times 10^3$ células/ cm^2 en medio de cultivo de expansión (control) o de diferenciación. La estimulación adipogénica fue iniciada por un medio inductor conteniendo DMEM alto en glucosa (Thermo Scientific, Utah, USA), $1 \mu\text{M}$ Dexametasona, 0.5 mM Indometacina, $10 \mu\text{g/mL}$ Insulina, 100 mM 3-Isobutil-1-Metilxantina (Sigma-Aldrich Co., MO, USA), 10% SFB (Hyclone, Utah, USA) por 3 días, y por 3 días más en un medio de mantención de adipogénesis conteniendo DMEM alto en glucosa, $10 \mu\text{g}$ Insulina y 10% SFB. Esta estimulación fue repetida dos veces completando un total de 18 días de tratamiento. Se obtuvieron muestras los días 0, 6, 12 y 18 de tratamiento y se fijaron en $500 \mu\text{L}$ de buffer RLT (Qiagen, CA, USA) y $5 \mu\text{L}$ de β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Lous, USA) para Q-PCR.

2.7 Tinción Oil Red O

Las CMM bovinas fetales sometidas a diferenciación adipogénica fueron teñidas el día 18 de diferenciación utilizando tinción de Oil Red O (ORO) para visualizar vacuolas de lípidos. Las muestras fueron fijadas en Paraformaldehído al 4% por una hora, luego incubadas en $0,2\%$ ORO por dos horas y posteriormente lavadas en agua y teñidas con hematoxilina.

2.8 PCR-Cuantitativo

Se utilizó Q-PCR para cuantificar la expresión de las enzimas de metilación de ADN, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, de metilación de histonas *EZH2*, de demetilación de histonas *KDM6A*, y de genes endógenos *GAPDH* y β -*ACTINA*. El ARN total fue extraído utilizando un minikit RNAeasy (Qiagen, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total fue cuantificado mediante espectrofotometría (260 nm) (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado

mediante un kit Affinity Script QPCR cDNA (Stratagene, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se realizó utilizando un kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, CA, USA) y un termociclador Step One (Applied Biosystems, CA, USA). Cada tubo de reacción contenía 12,5 μ L de Master Mix, 200 nM de primers, 0,375 μ L de tinción de referencia ROX, 2 μ L de ADNc y agua hasta alcanzar un volumen final de 25 μ L. La expresión de los genes fue cuantificada mediante el método de $\Delta\Delta$ CT. Las secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en Q-PCR se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados en el análisis de expresión génica

Gen	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Nº Acceso
<i>GAPDH</i>	Forward CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	NM 001034034.2
	Reverse TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	
β - <i>ACTINA</i>	Forward CGCACCCTGGCATTGTCAT	K00622.1
	Reverse TCCAAGGCGACGTAGCAGAG	
<i>DNMT1</i>	Forward TGACTCCACCTACGAAGACC	NM 182651.2
	Reverse TCTCTACTTGCTCCACCACG	
<i>DNMT3A</i>	Forward CAACGGAGAAGCCTAAGGTCAA	NM 001206502.1
	Reverse TTGAGGCTCCCACAAGAGATG	
<i>DNMT3B</i>	Forward AGTATCAGGATGGGAAGGAGTTTG	NM 181813.2
	Reverse CCAGGAGAAACCCTTGATCTTTC	
<i>EZH2</i>	Forward ACCCCCACCATCAACGTG	NM 001193024.1
	Reverse ACCGGTGTTTCTCTTCTTCTT	
<i>KDM6A</i>	Forward ACAAACCTGGCAACATAATACAG	NM 001206575.1
	Reverse AAAGTTGACCAAATAAAGACTTA	

2.9 Análisis de datos

Los datos de tres experimentos independientes se calcularon como media y desviación estándar. Los valores de expresión relativa de las enzimas *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *EZH2* y *KDM6A*, fueron analizados mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilks. Posteriormente los efectos de los días de cultivo y de tratamiento fueron evaluados por

ANOVA de una vía. Los promedios de expresión fueron comparados mediante el post-test de Duncan utilizando un valor de significancia ($P < 0,05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el “software” Info Stat.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento y diferenciación multilinaje de CMM

Las CMM fueron aisladas en base a su capacidad de adherencia a la superficie plástica de la placa de cultivo y mediante la identificación de su morfología fibroblastoide (Figura 1). Las células no adherentes al plástico (principalmente células hematopoyéticas y adipocitos) fueron removidas mediante sucesivos cambios de medio. Posteriormente las CMM fueron cultivadas en monocapa y expandidas mediante sucesivos pasajes.

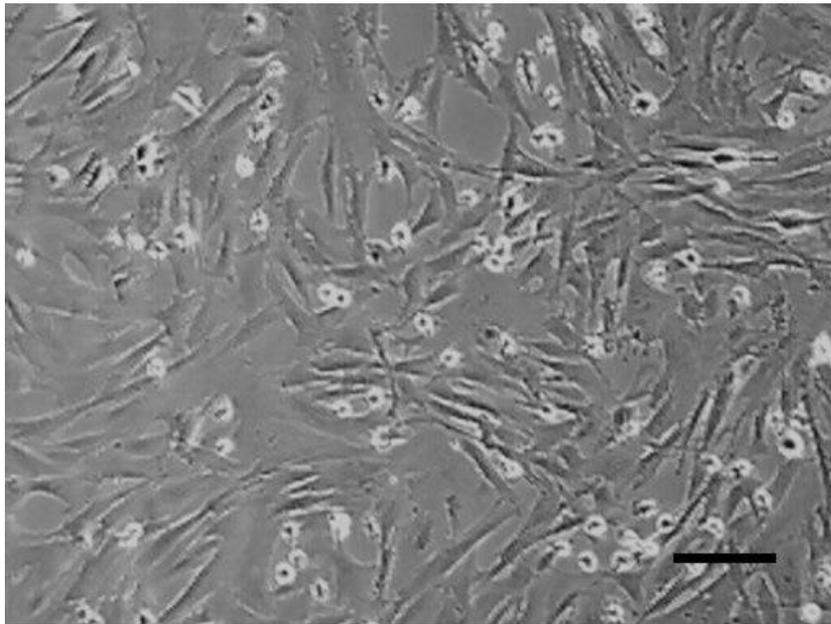


Figura 1. Microfotografía de contraste de fase de CMM aisladas de médula ósea bovina en base a su capacidad de adherencia al plástico. Luego de múltiples pasajes las CMM fueron cultivadas en monocapa mostrando su característica morfología fibroblastoide. Barra de Escala = 25 μ m.

Las CMM luego de ser cultivadas en presencia de factores osteoinductores por un período de 24 días exhibieron una gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas, obteniendo una forma estrellada diferente a la morfología fibroblástica exhibida en el control y conformando una matriz extracelular. Asimismo mediante la tinción de Von Kossa fue posible detectar depósitos de minerales (zonas de coloración oscura) en el citoplasma celular y en menor medida en la matriz extracelular (Figura 2B).

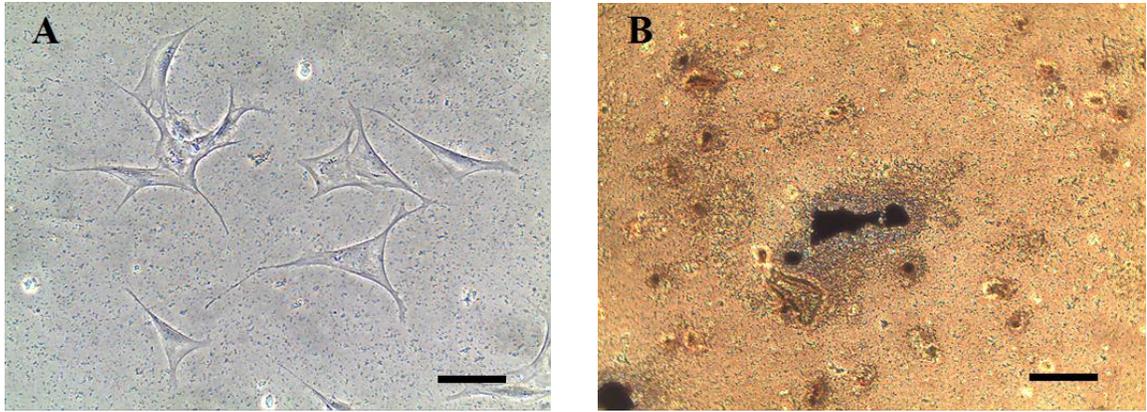


Figura 2. Microfotografías de CMM fetales bovinas sometidas a tinción de Von Kossa. (A) CMM al día 24 de cultivo control. (B) CMM al día 24 de en medio de cultivo osteogénico, donde se aprecian depósitos de minerales teñidos de oscuro. Barra de escala= 25 µm (A, B).

Paralelamente, las CMM fueron expuestas a factores condroinductores mediante cultivo en micromasa por 21 días (Figura 3A). Al finalizar el periodo de cultivo fue posible obtener un pellet compacto y consistente que fue sometido a análisis histológico para tinción con Azul de Alcian (Figura 3B). En los cortes histológicos se observó una morfología celular redondeada con presencia de matriz celular reactiva a la tinción indicando presencia de depósito de Glicosaminoglicanos (Figura 3C).

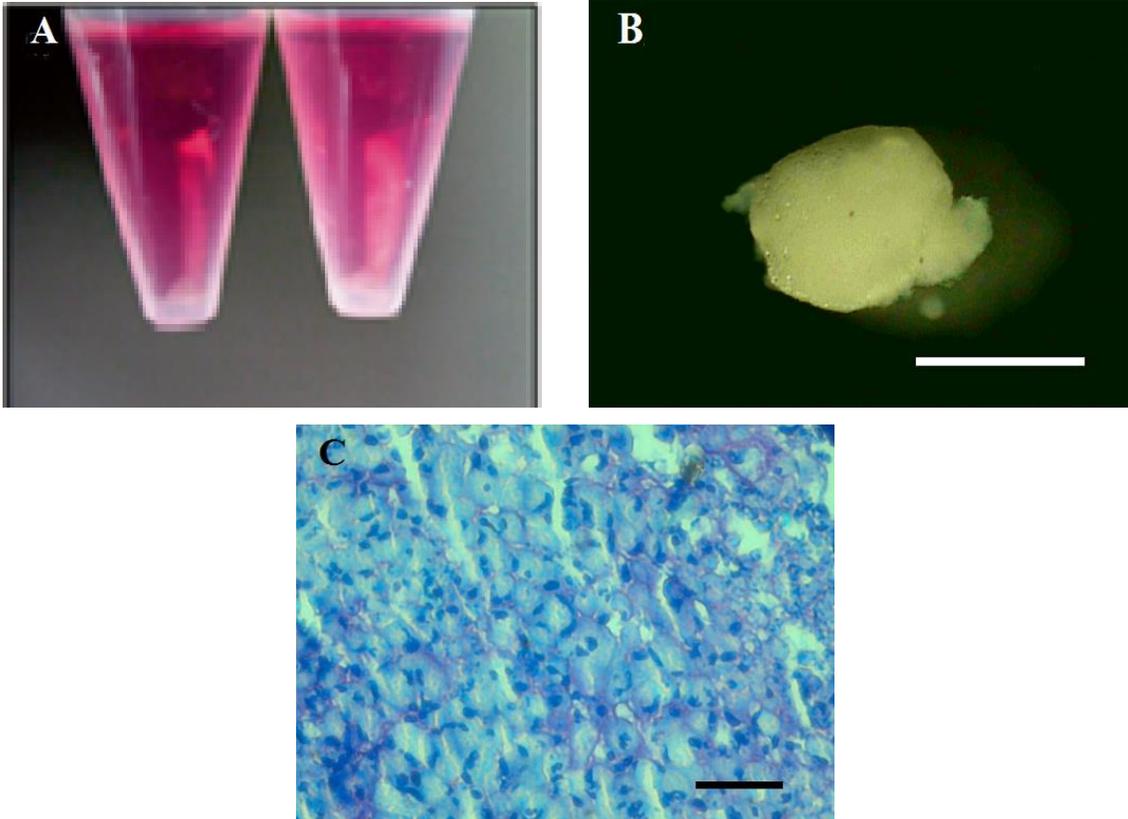


Figura 3. Análisis de CMM fetales bovinas sometidas a diferenciación condrogénica bajo condiciones de cultivo *in vitro*. (A) CMM bajo diferenciación condrogénica en micromasa. (B) Pellet compacto formado al día 21 luego de cultivo de CMM en micromasa bajo diferenciación condrogénica. (C) Corte histológico del pellet teñido con Azul de Alcian. Barra de escala= 2 mm (B), 100 μ m(C).

Las CMM al día 18 de la diferenciación adipogénica se agruparon principalmente en agregados de células. La tinción de ORO permitió detectar presencia de vacuolas de lípidos en el citoplasma de estas células (Figura 4B).

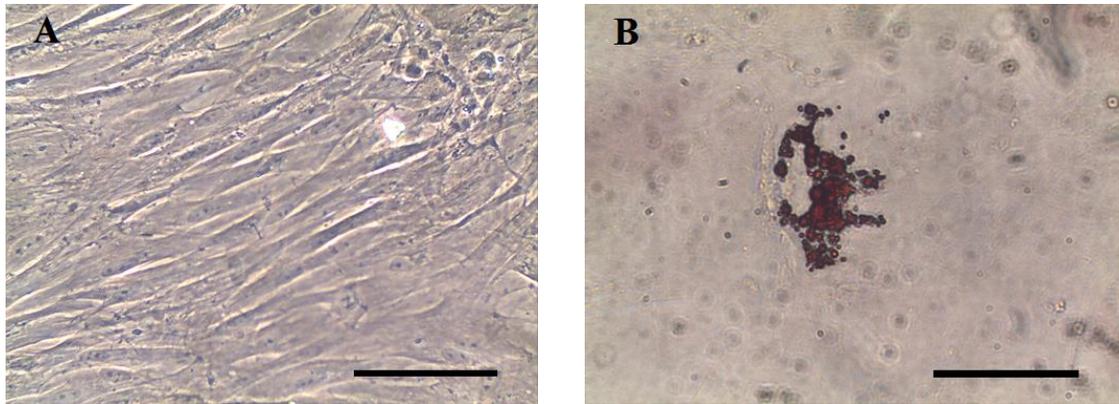


Figura 4. Microfotografías de CMM fetales bovinas sometidas a tinción ORO. (A) CMM a los 18 días de cultivo en medio control. (B) CMM a los 18 días de cultivo adipogénico, con vacuolas lipídicas teñidas de rojo. Barra de escala= 500 μ m (A, B).

3.2 Expresión de enzimas de regulación epigenética en CMM fetales bovinas durante diferenciación osteogénica

3.2.1 Expresión de enzimas de metilación de ADN en CMM fetales bovinas durante diferenciación osteogénica

Inicialmente se cuantificaron los niveles de expresión relativa del ARNm de las enzimas *DNMT1*, *DNMT3A* y *DNMT3B* durante la diferenciación osteogénica de las CMM. Se obtuvieron muestras desde los cultivos de CMM diferenciadas y control los días 0, 8, 16 y 24 de cultivo. El análisis de la expresión del ARNm de *DNMT1* no detectó diferencias ($P > 0,05$) entre tratamientos para los días 0, 8 y 16. Sin embargo, el día 24 de cultivo se detectó una mayor ($P < 0,05$) expresión en las CMM control en comparación con el día 0 (4,1 veces la expresión del día 0; Figura 5A). A diferencia del patrón de expresión encontrado para *DNMT1*, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de ARNm para los genes *DNMT3A* y *DNMT3B*, tanto entre días de cultivo como entre tratamientos (Figura 5B y C).

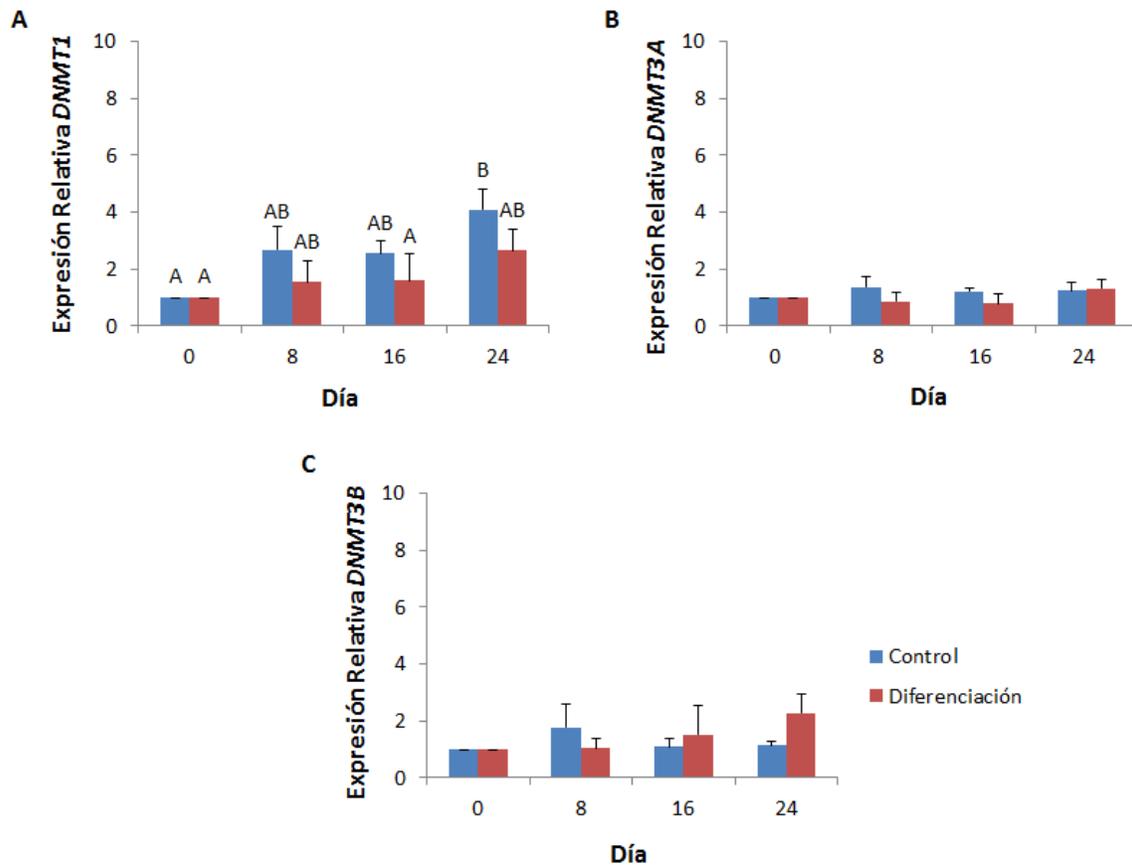


Figura 5. Expresión relativa de ARNm de *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B) y *DNMT3B* (C) en CMM fetales bovinas cultivadas por 24 días en medio de cultivo osteogénico y control. Se detectó un aumento ($P < 0,05$) de expresión de ARNm de *DNMT1* en CMM control el día 24 de cultivo. No se detectaron diferencias ($P > 0,05$) en los niveles de ARNm de *DNMT3A* y *DNMT3B* entre días de cultivo y tratamientos. Superíndices distintos (A,B) indican diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos.

3.2.2 Expresión de enzimas asociadas a metilación de histonas en CMM fetales bovinas durante diferenciación osteogénica

Se cuantificó la expresión relativa del ARNm de la enzima *EZH2* durante la diferenciación osteogénica de CMM. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión del ARNm de *EZH2* entre días de cultivo o tratamientos (Figura 6A). Sin

embargo, para la expresión del ARNm de *KDM6A* se detectó un aumento ($P < 0,05$) al día 24 de diferenciación (4,06 veces la expresión del día 0; Figura 6B).

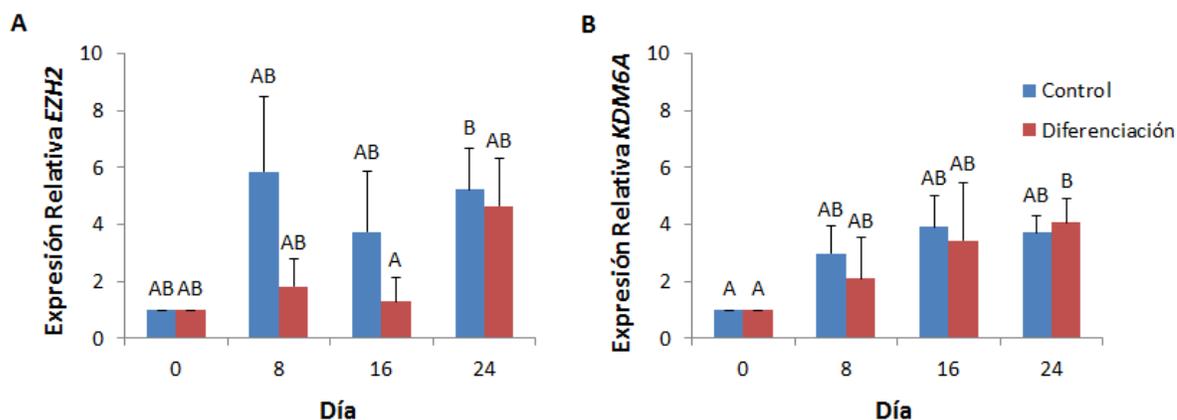


Figura 6. Expresión relativa de ARNm de *EZH2* (A) y *KDM6A* (B) en CMM fetales bovinas cultivadas por 24 días en medio de cultivo osteogénico y control. No se detectaron diferencias ($P > 0,05$) entre días de cultivo y tratamientos para *EZH2*. Sin embargo se detectó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *KDM6A* al día 24 de diferenciación. Superíndices distintos (A,B) indican diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos.

3.3 Expresión de enzimas de regulación epigenética en CMM fetales bovinas durante diferenciación condrogénica

3.3.1 Expresión de enzimas de metilación de ADN en CMM fetales bovinas durante diferenciación condrogénica

Se cuantificó la expresión relativa del ARNm de los genes *DNMT1*, *DNMT3A* y *DNMT3B* durante la diferenciación condrogénica de CMM fetales bovinas. Las muestras fueron obtenidas los días 0, 7, 14 y 21, para las células diferenciadas y controles. En la enzima *DNMT1* se detectó una disminución ($P < 0,05$) en la expresión de ARNm al día 7 de diferenciación, en relación al día 7 control. Asimismo se detectó una disminución ($P < 0,05$) en la expresión al día 21 control, en relación al día 0 (Figura 7A). En cuanto a la expresión

de ARNm de *DNMT3A* también se detectó una disminución ($P<0,05$) al día 7 de diferenciación en relación al día 0 (0,05 veces la expresión del día 0) y posteriormente una disminución al día 21 control en relación al día 0 (0,008 veces la expresión del día 0; Figura 7B). Para el gen *DNMT3B* se detectó un comportamiento similar a *DNMT1*, con niveles de expresión significativamente disminuidos al día 7 de diferenciación en relación al día 7 control y una disminución ($P<0,05$) el día 21 control en comparación al día 0 (Figura 7C).

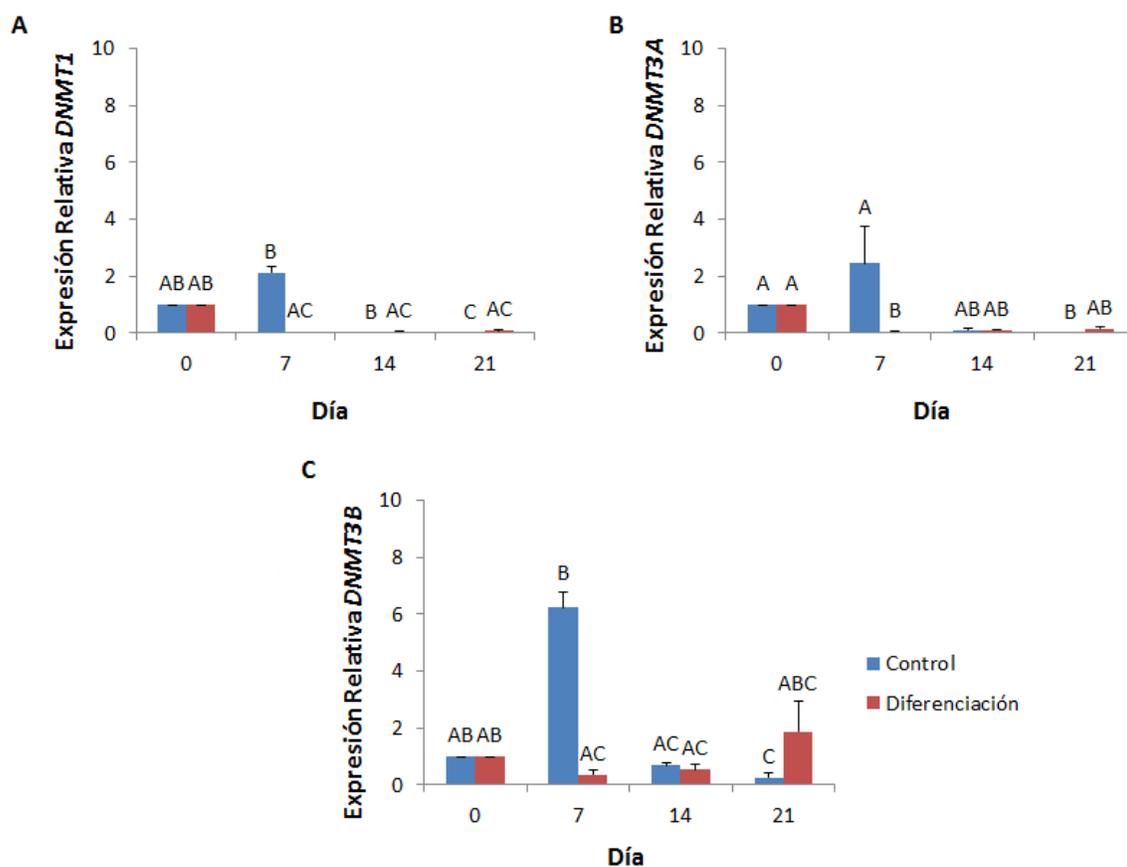


Figura 7. Expresión relativa de ARNm de *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B) y *DNMT3B* (C) en CMM fetales bovinas cultivadas por 21 días en medio de cultivo condrogénico y control. Se detectó un menor ($P<0,05$) nivel de ARNm de *DNMT1* al día 7 en CMM bovinas cultivadas en medio de cultivo condrogénico, en relación al día 0. Asimismo se detectó una disminución ($P<0,05$) en la expresión de ARNm de *DNMT3A* al día 7 de diferenciación en relación al control y el día 21 control en relación al día 0. Además se detectó una disminución ($P<0,05$) en los niveles de ARNm de *DNMT3B* en el cultivo diferenciación al

día 7. Superíndices distintos (A,B) indican diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos

3.3.2 Expresión de enzimas asociadas a metilación de histonas en CMM fetales bovinas durante diferenciación condrogénica

Se determinó la expresión de ARNm de la enzima *EZH2* en las CMM fetales bovinas de los cultivos diferenciación condrogénica y control (Figura 8A). En este análisis se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de expresión de *EZH2* al día 7 de diferenciación con respecto al día 0 (0,02 veces la expresión del día 0), y al día 21 control en relación al día 0 (0,04 veces la expresión del día 0). En forma similar, la enzima *KDM6A*, disminuyó sus niveles de expresión el día 7 en CMM diferenciadas (0,04 veces la expresión del día 0) y el día 21 en CMM control (0,06 veces la expresión del día 0; Figura 8B)

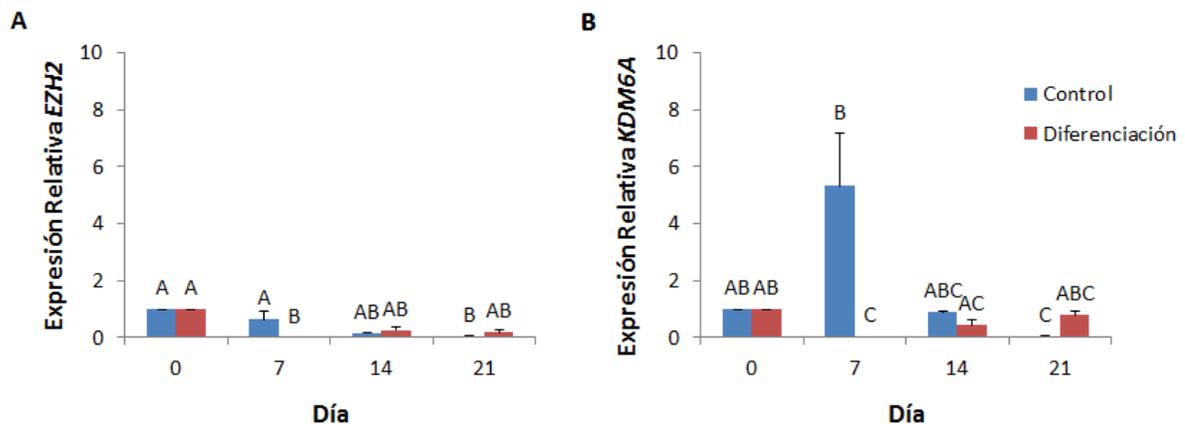


Figura 8. Expresión relativa de ARNm de *EZH2* (A) y *KDM6A* (B) en CMM fetales bovinas cultivadas por 21 días en medio de cultivo condrogénico y control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *EZH2* a los días 7 diferenciación y 21 control en relación al día 0. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *KDM6A* al día 7 de la diferenciación y al día 21 control. Superíndices distintos (A,B) indican diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos.

3.4 Expresión de enzimas de regulación epigenética en CMM fetales bovinas durante diferenciación adipogénica

3.4.1 Expresión de enzimas de metilación de ADN en CMM fetales bovinas durante diferenciación adipogénica

Se cuantificó la expresión relativa del ARNm de las enzimas *DNMT1*, *DNMT3A* y *DNMT3B* durante la diferenciación adipogénica de CMM fetales bovinas. Las muestras fueron obtenidas los días 0, 6, 12 y 18, del cultivo diferenciación y control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *DNMT1* el día 6 en las CMM expuestas a la diferenciación adipogénica (0,3 veces la expresión del día 0), y al día 18 en CMM control (0,2 veces la expresión del día 0; Figura 9A). En cuanto a la expresión relativa de ARNm de *DNMT3A* se detectó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm los días 12 y 18 de diferenciación con respecto al día 0 (4,6 y 4,9 veces el día 0, respectivamente; Figura 9B). En los niveles de ARNm de *DNMT3B* en cambio, se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm los días 12 y 18 control (0,3 y 0,2 veces el día 0, respectivamente; Figura 9C).

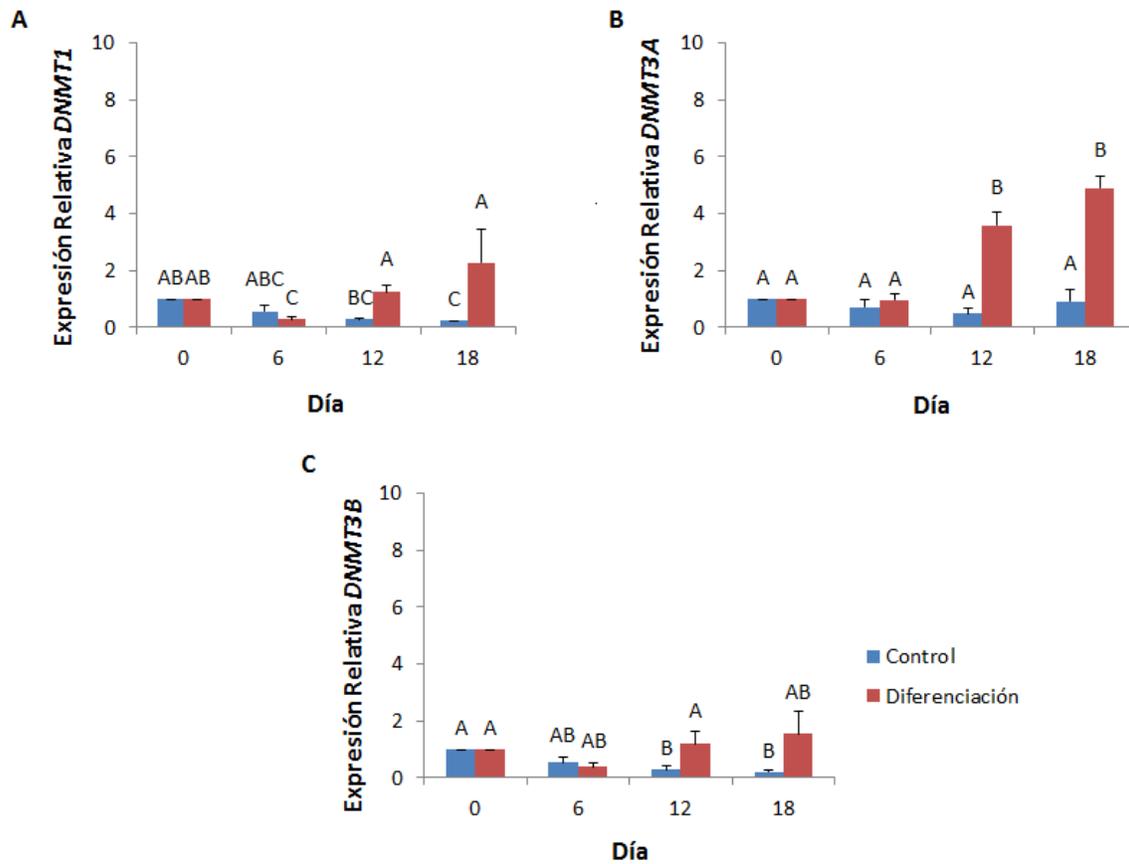


Figura 9. Expresión relativa de ARNm de *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B) y *DNMT3B* (C) en CMM fetales bovinas cultivadas por 18 días en medio de cultivo adipogénico y control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *DNMT1* los días 6 del cultivo control y 18 del cultivo diferenciación. En los niveles de ARNm de *DNMT3A* se detectó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm los días 12 y 18 del cultivo diferenciación en relación al día 0. Para los niveles de expresión de ARNm de *DNMT3B* se detectó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm el día 12 de la diferenciación en relación al cultivo control. Superíndices distintos (A,B) indican diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos

3.4.2 Expresión de enzimas asociadas a metilación de Histonas en CMM fetales bovinas durante diferenciación adipogénica

Se cuantificó la expresión relativa de ARNm de *EZH2* donde se detectó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm al día 18 de diferenciación (5 veces la expresión del día

0; Figura 10A). Al cuantificar la expresión de *KDM6A*, no se detectaron diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos (Figura 10B).

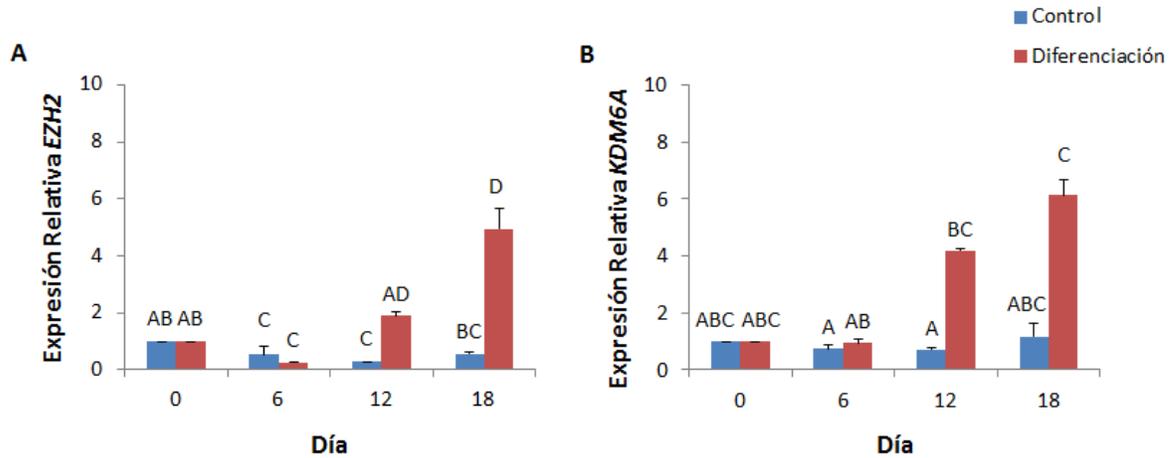


Figura 10. Expresión relativa de ARNm de *EZH2* (A) y *KDM6A* (B) en CMM fetales bovinas cultivadas por 18 días en medio de cultivo adipogénico y control. Se detectó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *EZH2* el día 18 de la diferenciación en relación al día 0. En cambio en los niveles de ARNm de *KDM6A* no se detectaron diferencias ($P < 0,05$) entre días de cultivo y tratamientos. Superíndices distintos (A,B) indican diferencias significativas entre días de cultivo y tratamientos.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se cuantificó la expresión relativa de enzimas que catalizan los procesos de metilación del ADN (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B), metilación de histonas (EZH2) y demetilación de histonas (KDM6A) en CMM fetales bovinas durante los procesos de diferenciación *in vitro* osteogénico, condrogénico y adipogénico.

A pesar de que las CMM representan sólo el 0,001 al 0,01% del total de células nucleadas presentes en la medula ósea, estas células pueden ser aisladas mediante su capacidad de adhesión a las placas de cultivo de plástico. Esta capacidad es el primer requisito para la definición de CMM según ha establecido la International Society for Cell Therapy (ISCT). Requisitos adicionales incluyen la expresión de marcadores de superficie de linaje mesenquimal y la capacidad de diferenciación en los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Dominici *et al.*, 2006). Adicionalmente, las CMM pueden ser identificadas parcialmente en base a su morfología, que en el caso del presente estudio, fue mayoritariamente fibroblastoide o fusiforme, coincidente con estudios realizados previamente en CMM bovinas extraídas de terneros (Bosnakovski *et al.*, 2005). El aislamiento de las CMM según adherencia al plástico y por morfología se constituye como un método de bajo costo, en comparación al uso de citometría de flujo y esferas micromagnéticas (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008). Sin embargo, no constituye un método específico, debido a que existen otras células con capacidad de adherencia al plástico como fibroblastos, adipocitos y células hematopoyéticas (Rastegar *et al.*, 2010). Sin embargo, el análisis de citometría de flujo con marcadores mesenquimales realizados previamente en nuestro laboratorio indican que las células aisladas bovinas mediante esta técnica corresponden en un alto porcentaje (96,8%) a CMM positivas al marcador mesenquimal CD73 (Dueñas *et al.*, 2014).

El cultivo, expansión y posterior diferenciación *in vitro* de las CMM hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico fue realizado según protocolos previamente reportados (Bosnakovski *et al.*, 2004) y probados en nuestro laboratorio (Cortes *et al.*, 2013; Dueñas *et al.*, 2014). La diferenciación osteogénica fue identificada fenotípicamente mediante el cambio de morfología celular caracterizado por un aumento de proyecciones citoplasmáticas y producción de matriz ósea extracelular. El fenotipo osteogénico fue

ratificado mediante identificación de depósitos de calcio utilizando la tinción de Von Kossa. Por otra parte, la diferenciación condrogénica de las CMM fue realizada mediante cultivo en sistema de micromasa que consiste en cultivo de células agregadas en pellet mediante centrifugación (Eslaminejad *et al.*, 2006). Al realizar análisis histológico de las micromasas se detectó presencia de glicosaminoglicanos sulfatados característicos del tejido cartilaginoso mediante tinción con Azul de Alcian (Bosnakovski *et al.*, 2004). Finalmente, en el caso de la diferenciación adipogénica, fue posible detectar vacuolas lipídicas mediante tinción con ORO en las CMM bovinas fetales diferenciadas. Los cambios morfológicos de las CMM bovinas fetales expuestas a los factores de diferenciación *in vitro* sumado a la evidencia de las tinciones tejido específicas indican el potencial multipotente de estas células (Dominici *et al.*, 2006).

Durante la diferenciación osteogénica, no se detectaron diferencias en los niveles de ARNm de las enzimas de metilación DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, en las CMM diferenciadas. Estos resultados coinciden con reportes previos en CMM humanas donde se describe que la diferenciación osteogénica *in vitro* sucede sin cambios notables en los patrones de metilación celular (Kang *et al.*, 2007). Sin embargo, estos resultados han sido controversiales, ya que adicionalmente se ha descrito en otros estudios que la diferenciación osteogénica es mediada por un alto nivel de metilación *de novo* en regiones represoras de la expresión génica (Teven *et al.*, 2011). A pesar de que en nuestro estudio no se determinó la actividad de las enzimas ni la expresión de estas a nivel proteico, nuestros resultados sugieren que estas enzimas participantes en los procesos de metilación del ADN no cumplen un rol significativo durante la diferenciación osteogénica de CMM bovinas fetales.

En el presente estudio no se detectaron diferencias significativas entre tratamiento o días de cultivo para la expresión de EZH2 durante la diferenciación osteogénica. Esta enzima forma parte del complejo proteico represor de la transcripción PolyComb, que contribuye a la mantención del estado indiferenciado de las CMM (Gil *et al.*, 2005; Sauvageau y Sauvageau, 2008). A diferencia de EZH2, se detectó un aumento en los niveles de expresión de la enzima KDM6A el día 24 de diferenciación osteogénica. Estos resultados sugieren que existe un mayor grado de demetilación de histonas hacia el final de la

diferenciación osteogénica. KDM6A es responsable de revertir la acción de EZH2 (Lunyak y Rosenfeld, 2008), lo cual ayudaría a explicar los bajos niveles de expresión de EZH2. Adicionalmente, el efecto de KDM6A mediaría la inhibición del estado de indiferenciación de las CMM estimulando el proceso de diferenciación.

A diferencia de lo determinado en la diferenciación osteogénica, los niveles de ARNm de las enzimas DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, EZH2 y KDM6A fueron menores el día 7 de diferenciación condrogénica en relación al control para ese día. El sistema de cultivo en micromasa induce agregación celular al día 7 e inicia un proceso de condensación cartilaginosa premesenquimal (Tuli *et al.*, 2003). Este proceso se caracteriza por un aumento en la síntesis de moléculas de adhesión celular, formación de uniones intercelulares y activación de genes de matriz extracelular (Bosnakovski *et al.*, 2004). La condensación cartilaginosa premesenquimal puede estar asociada a un proceso masivo de activación de genes que requiere la reconfiguración del patrón de metilación del genoma y por lo tanto de la inactivación de enzimas de metilación como DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y EZH2. Este fenómeno explicaría porque las enzimas de metilación se encuentran disminuidas al inicio del proceso de diferenciación condrogénica.

Durante la diferenciación adipogénica, se detectó una disminución en los niveles de expresión de la enzima DNMT1 al día 6 de diferenciación. Según la búsqueda en la literatura científica, la enzima DNMT1 no ha sido descrita como participante del proceso de adipogénesis (Teven *et al.*, 2011). Adicionalmente, se detectaron mayores niveles de expresión de DNMT3A y DNMT3B en las etapas tardías del proceso de diferenciación adipogénica. Estos resultados son contrarios a lo descrito para CMM humanas, donde se presenta una mayor actividad de metilación *de novo* en la etapa de determinación, la cual ocurre en etapas tempranas de la diferenciación adipogénica (Rosen y MacDougald, 2006). Contrariamente, en nuestro estudio se describe una mayor actividad de metilación en una etapa más avanzada del proceso de diferenciación. Estas diferencias en la activación de las enzimas pueden ser consecuencia de variaciones entre la especie bovina en relación a la especie humana.

En el caso de la enzima EZH2, se detectó al día 18 de cultivo un aumento en los niveles de expresión durante la diferenciación adipogénica. Como fue descrito anteriormente, la

actividad de esta enzima ha sido vinculada al mantenimiento del estado indiferenciado de las CMM (Gil *et al.*, 2005; Sauvageau y Sauvageau, 2008). En CMM aisladas de tejido adiposo humano y posteriormente diferenciadas hacia linaje adipogénico, se ha descrito la mantención del estado de trimetilación en H3K27 luego de varios pasajes, sitio metilado por esta enzima (Noer *et al.*, 2009). Estos datos sugieren una mayor actividad de EZH2, enzima que cataliza la metilación de este sitio hacia el final de proceso de diferenciación. Por otro lado, no se detectaron diferencias entre tratamientos para la enzima KDM6A, la cual permite una mayor actividad de EZH2. En general, las enzimas estudiadas mostraron una mayor expresión hacia el final de la diferenciación adipogénica de CMM, lo que sugiere que en esta etapa podría requerir un mayor silenciamiento de genes asociados a otros linajes.

Durante los análisis de expresión génica se detectaron variaciones en la expresión de ARNm en CMM controles. Estas variaciones en CMM controles pueden ser explicadas por cambios en la expresión de genes o desregulación de mecanismos epigenéticos producidos por efecto del medio de cultivo y las condiciones *in vitro* en que las CMM controles fueron mantenidas durante periodos extensos de tiempo.

Los resultados de este trabajo se basan solamente en análisis de niveles de ARNm, por lo que se requiere cuantificación de niveles de proteínas y de actividad enzimática. Sin embargo, basados en los resultados hemos podido describir el patrón transcripcional de enzimas participantes en los procesos de metilación del ADN y metilación y demetilación de histonas durante los procesos de diferenciación multilinaje de CMM bovinas fetales. El aumento de los niveles de expresión de las enzimas evaluadas sugiere que existe una alta regulación epigenética durante la diferenciación adipogénica. Además, el aumento en la expresión de la enzima KDM6A sugiere una asociación con el proceso de diferenciación osteogénica. Finalmente, los resultados sugieren que no hay una asociación entre los niveles de expresión de las enzimas evaluadas y el proceso de diferenciación condrogénica.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada a través del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT (proyecto N° 11100205). Se agradece el suministro de fetos bovinos a la Faenadora y Frigorífico Cordillera S.A., y la disponibilidad de equipos para los análisis de Q-PCR al Laboratorio Vaccimed (FAVET-Universidad de Chile).

Gracias al Doctor Oscar Peralta por su buena disposición, paciencia y conocimiento. A Yenni, Paulina y Fernando, mis compañeros y amigos de laboratorio.

No podría dejar de agradecer a mis padres y hermanos, a Daniela, y a mis amigos Christian, Gustavo y Felipe, por su apoyo incondicional.

BIBLIOGRAFÍA

AGGER, K.; CLOOS, P.A.C.; CHRISTENSEN, J.; PASINI, D.; ROSE, S.; RAPPSILBER, J.; ISSAEVA, I.; CANAANI, E.; SALCINI, A.E.; HELIN, K. 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*. 449 (7163): 731-734.

BESTOR, T.H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2395-2402.

BIRD, A. 2007. Perception of epigenetics. *Nature*. 447 (7143): 396-398.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; ISHIGURO, T.; OKUMURA, M.; IWANAGA, T.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. 2004. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp. Hematol.* 32: 502-509.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell. Tissue Res.* 319(2):243-253

CAPLAN, A.I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9: 641-650.

CHOI, K.M.; SEO, Y.K.; YOON, H.H.; SONG, K.Y.; KWON, S.Y.; LEE, H.S.; PARK, J.K. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J. Biosci. Bioeng.* 105 (6): 586-594.

CHUNG, C.H.; GOLUB, E.E.; FORBES, E.; TOKUOKA, T.; SHAPIRO, I.M. 1992. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue. Int.* 51 (4): 305-311.

COEHLO, M.J.; FERNANDES, M.H. 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* 21 (11): 1095-1102.

COLLAS, P. 2010. Programming differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Epigenetics.* 5 (6): 476-482.

COLLAS, P.; NOER, A.; SØRENSEN, A.L. 2008. Epigenetic basis for the differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus. Med. Hemoth.* 35: 205-215.

CORTES, Y.; OJEDA, M.; ARAYA, D.; DUEÑAS, F.; FERNÁNDEZ, M.S.; PERALTA, O.A. 2013. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived fetuses. *BMC Vet. Res.* 9: 133-146.

DERFOUL, A.; PERKINS, G.; HALL, D.; TUAN, R. 2006. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells.* 24: 1487-95

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.

DUEÑAS, F.; BECERRA, V.; CORTES, Y.; VIDAL, S.; SÁENZ, L.; PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M.; PERALTA, OA. 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet. Res.* 10: 154-166.

ESLAMINEJAD, M.B.; FANI, N.; SHAHHOSEINI, M. 2013. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J.* 15 (1): 1-10.

ESLAMINEJAD, M.B.; NIKMAHZAR, A.; PIRIEA, A. 2006. The structure of human mesenchymal stem cells differentiated into cartilage in micro mass culture system. *Y. Med. J.* 8(3): 162-171.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3: 393-403.

GIL, J.; BERNARD, D.; PETERS, G. 2005. Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA Cell. Biol.* 24 (2): 117-125.

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: 105-123.

HOMBACH-KLONISCH, S.; PANIGRAHI, S.; RASHEDI, I.; SEIFERT, A.; ALBERTI, E.; POCAR, P.; KURPISZ, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; MACKIEWICZ, A.; LOS, M. 2008. Adult stem cells and their trans-differentiation potential perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med.* 86:1301-1314.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 7 (5): 393-395.

JAENISCH, R.; BIRD, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics.* 33: 245-254.

KAAS, S.U.; PRUSS, D.; WOLFFE, A.P. 1997. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet.* 13: 444-499.

KANG, M.I.; KIM, H.S.; JUNG, Y.C.; KIM, Y.H.; HONG, S.J.; KIM, M.K.; BAEK, K.H.; KIM, C.C.; RHYU, M.G. 2007. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J. Cell. Biochem.* 102(1): 224-239.

- KOMORI, T.** 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* 99 (5): 1233-1239.
- KOUZARIDES, T.** 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128 (4): 693-705.
- LEHMANN, J.; LENHARD, J.; OLIVER, B.; RINGOLD, G.; KLIEWER, S.** 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 6: 3406-3410.
- LI, H.X.; XIAO, L.; WANG, C.; GAO, J.L.; ZHAI, Y.G.** 2010. Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *J. Zhejiang Univ-Sci B.* 11 (10): 784-791.
- LUNYAK, V.V.; ROSENFELD, M.G.** 2008. Epigenetic regulation of Stem Cell fate. *Hum. Mol. Genet.* 17 (1): 28-36.
- NOER, A.; LINDEMAN, L.C.; COLLAS, P.** 2009. Histone H3 modifications associated with differentiation and long-term culture of mesenchymal adipose stem cells. *Stem Cells Dev.* 18: 725-735.
- PHILLIPS, J.E.; GERSBACH, C.A.; WOJTOWICZ, A.M.; GARCÍA, A.J.** 2006. Glucocorticoid induced osteogenesis is negatively regulated by runx 2/ cbfa 1 serine phosphorylation. *J Cell Sci.* 119: 581 – 591.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R.** 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143-147.
- RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.Q.; HE, B.C.; CHEN, L.; ZUO, G.W.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E.R.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.L.; KIM, S.H.; ZHOU, J.Z.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R.R.; LUU, H.H.; HAYDON, R.C.; DENG, Z.L.; HE, T.C.** 2010. Mesenchymal Stem cells: molecular characteristics and clinical applications. *W. J. Stem Cells.* 2 (4): 67-80.
- ROSEN, E.D.; MACDOUGALD, O.A.** 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7 (12): 885-896.
- SAUVAGEAU, M.; SAUVAGEAU, G.** 2008. PolyComb group genes: keeping stem cell activity in balance. *PLoS Biol.* 6 (4): 678-681.
- SCHWARTZ, Y.B.; PIRROTTA, V.** 2007. Polycomb silencing mechanisms and management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* 8 (1): 9-22.
- SUN, L.; NICHOLSON, C.; HAJJAR, D.; GOTTO, A.; HAN, J.** 2003. Adipogenic differentiating agent regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J. Lipid Res.* 44: 1877-1886.
- TAKAI, D.; JONES, P.A.** 2003. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol.* 3: 235-240

- TAPP, H.; DEEPE, R.; INGRAM, J.A.; KUREMSKY, M.; HANLEY, E.N.; GRUBER, H.E.** 2008. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta an 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix. *Arthritis Res. Ther.* 10 (4): R89
- TERUEL, T.; VALVERDE, A.; BENITO, M.; LORENZO, M.** 1996. Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem. J.* 319: 627-632.
- TEVEN, C.M.; LIU, X.; HU, N.; TANG, N.; KIM, S.H.; HUANG, E.; YANG, K.; LI, M.; GAO, J.L.; NATALE, R.B.; LUTHER, G.; LUO, Q.; WANG, L.; RAMES, R.; BI, Y.; LUO, J.; LUU, H.H.; HAYDON, R.C.; REID, R.R.; HE, T.C.** 2011. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem. Cells. Int.* 2011: 1-18.
- 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 B-mediate chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase, and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* 278 (42): 41227-36
- TUREK-PLEWA, J.; JAGODZINSKI, P.P.** 2005. The role of mammalian methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10 (4): 631-647.
- VILLAGRA, A.; GUTIÉRREZ, J.; PAREDES, R.; SIERRA, J.; PUCHI, M.; IMSCHENETZKY, M.; WIJNEN, A.A.; LIAN, J.; STEIN, G.; STEIN, J.; MONTECINO, M.** 2002. Reduced CpG methylation is associated with transcriptional activation of the bone-specific rat osteocalcin gene in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 85 (1): 112-122.
- WEI, Y.; CHEN, Y.H.; LI, L.Y.; LANG, J.; YEH, S.P.; SHI, B.; YANG, C.C.; YANG, J.Y.; LIN, C.Y.; LAI, C.C.; HUNG, M.C.** 2010. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 supresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat. Cell. Biol.* 13 (1): 87-94.
- ZHANG, Y.; REINBERG, D.** 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15: 2343-2360.