



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMÁTICAS (CMM) OBTENIDAS DESDE MÉDULA  
ÓSEA FETAL BOVINA**

**FERNANDO DUEÑAS TAMAYO**

Tesis para optar al Grado de  
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias  
Mención Ciencias Animales

Santiago-Chile

2017



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMÁTICAS (CMM) OBTENIDAS DESDE MÉDULA  
ÓSEA FETAL BOVINA**

**FERNANDO DUEÑAS TAMAYO**

Tesis para optar al Grado de  
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias  
Mención Ciencias Animales

**DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PERALTA T.**

Santiago-Chile

2017



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

**FERNANDO DUEÑAS TAMAYO**

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS CON MENCIÓN CIENCIAS ANIMALES, EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 8 DE MAYO DE 2017

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. OSCAR PERALTA T. ....

**COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS**

DR. JOSÉ IGNACIO ARIAS F. ....

DRA. MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ G. ....

**Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio Centralizado de Investigación en Ciencias Veterinarias (LACIV) y en el Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile  
y contó con financiamiento**

**Fondecyt 11100205**

## BIOGRAFÍA

Soy Fernando Dueñas Tamayo, nacido en Duitama (Colombia) en el año de 1982. Crecí bajo el amparo de una familia tradicional, trabajadora y religiosa donde el respeto y buenas conductas estuvieron presentes siempre. Mi niñez transcurrió dentro de un ambiente pecuario, ya que mis padres poseen una pequeña producción ganadera, de aquí mi interés en la producción y medicina animal, de niño aspiraba algún día poder ser parte activa de este bonito rubro. Mi vida escolar empezó para el año de 1989, ingresando a una escuela rural (Escuela El Carmen), en este plantel educativo curse hasta quinto año primaria, donde se forjaron las primeras bases en mi formación académica. Para el año de 1993 al terminar mi educación primaria, mis padres deciden trasladarme a la ciudad de Duitama para continuar mis estudios de educación secundaria (1994), en esta ciudad ingrese a estudiar al Colegio Salesiano de Duitama, donde continuaría mi formación académica dentro de una ambiente académico estricto y exigente, allí curse hasta el grado once, finalizando esta etapa académica para el año de 1999. Para este tiempo ya tenía definida cual sería mi inclinación profesional, ingrese a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia para dar inicio a la carrera profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, dentro de esta institución educativa recibí la formación académica para desempeñarme como médico veterinario, me incline mas por la producción y medicina de rebaños bovinos en lo cual me desempeñe, esto se basó principalmente en medicina y salud animal, economía pecuaria y producción animal (implementación de biotecnologías reproductivas indispensables en sistemas productivos eficientes). Para el año de 2011 decidí perfeccionar mis conocimientos e ingresar al Magister en Ciencias Animales y Veterinarias, de la Universidad de Chile, donde amplié y perfeccione conocimientos, en esta institución recibí formación vital para desempeñarme en el ámbito científico y poder desempeñarme en esta área y en la academia. Los resultados más relevantes de este trabajo de investigación fueron presentados en congresos relacionados con el área en los años 2012 y 2013. Además, resultado de este trabajo se produjo una publicación científica titulada “Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses”, publicado en BMC Veterinary Research. Agradezco sinceramente las herramientas que me brindo la Facultad para fortalecer mi formación profesional.

Espero que esta tesis de Magíster contribuya a la generación de nuevo conocimiento en la biología de las CMM.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

*SUMMARY*

1	INTRODUCCIÓN .....	12
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Biología de las células madre mesenquimales (CMM) .....	14
	Marcadores mesenquimales .....	17
2.2	Células madre mesenquimales en la especie bovina .....	18
2.3	Diferenciación neurogénica .....	20
	Marcadores de diferenciación neurogénica.....	23
3	OBJETIVOS .....	26
4	HIPÓTESIS .....	27
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
5.1	Obtención de médula ósea .....	28
5.2	Diferenciación Neurogénica.....	29
5.3	PCR-Cuantitativo .....	30
5.4	Inmunofluorescencia.....	30
5.5	Citometría de flujo.....	31
5.6	Análisis de Datos .....	32
6	RESULTADOS .....	34

6.1	Obtención de CMM desde medula ósea.....	34
6.1.1	Expansión, fijación celular y doblaje celular .....	35
6.1.2	Caracterización del cultivo celular .....	36
6.2	Diferenciación neurogénica .....	38
6.2.1	Protocolo 1 .....	38
6.2.2	Protocolo 2 .....	44
7	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	56
8	CONCLUSIONES .....	63
	BIBLIOGRAFÍA.....	64

## ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Tabla 1. Secuencia y número de acceso de primers utilizados para PCR-Cuantitativo.....	33
Figura 1. Extracción de MO desde espacio medular del fémur fetal bovino.....	34
Figura 2. Análisis morfológico de cultivo en monocapa de CMM durante el proceso de expansión y caracterización.....	35
Figura 3. Doblaje celular de CMM obtenidas desde medula ósea fetal bovina.....	37
Figura 4. Niveles de mRNA de marcadores superficiales mesenquimales y hematopoiéticos en población celular adherente al plástico extraída desde MO fetal bovina.....	37
Figura 5. Análisis de citometría de flujo de marcadores superficiales mesenquimales y hematopoiéticos en población celular adherente al plástico extraída desde MO fetal bovina.....	38
Figura 6. Microfotografías de CMM expuestas a protocolo 1 de diferenciación neurogénica.....	39
Figura 7. Expresión relativa de <i>NESTIN</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica de CMM aisladas desde MO fetal bovina.....	41
Figura 8. Expresión relativa de <i>MAP2</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas.....	41
Figura 9. Expresión relativa de <i>TrKA</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas.....	42
Figura 10. Expresión relativa de <i>NGF</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM fetales bovinas.....	43
Figura 11. Expresión relativa de <i>NANOG</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas.....	44
Figura 12. Microfotografía de cultivo de CMM fetales bovinas aisladas por medio de adherencia al plástico y expuestas a medio de diferenciación neurogénica (Protocolo 2).....	45
Figura 13. Expresión relativa de <i>NESTIN</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica de CMM bovinas (Protocolo 2).....	47

Figura 14. Expresión relativa de MAP2 durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).....	47
Figura 15. Expresión relativa de <i>TrKA</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).....	48
Figura 16. Expresión relativa de <i>NGF</i> durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).....	49
Figura 17. Expresión relativa de PrPC durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).....	50
Figura 18. Expresión relativa de NANOG durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).....	50
Figura 19. Inmunodetección de NESTIN en CMM fetales bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas.....	52
Figura 20. Inmunofluorescencia asociada a TRKA en CMM bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas.....	53
Figura 21. Inmunofluorescencia asociada a MAP2 en CMM bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas.....	54
Figura 22. Inmunofluorescencia asociada a PrPC en CMM bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas.....	55

## RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) son células progenitoras multipotentes que poseen potenciales de auto-renovación y diferenciación multilínea (osteogénico, condrogénico y adipogénico). La capacidad de diferenciación de las CMM se extiende principalmente hacia linajes mesodérmicos como osteogénico, condrogénico y adipogénico; sin embargo, estudios recientes *in vitro* han demostrado que las CMM poseen capacidad para diferenciarse hacia tejidos ectodérmicos como el neuronal. El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de diferenciación neurogénica *in vitro* de CMM bovinas aislada desde medula ósea (MO) fetal. La detección de marcadores mesenquimales CD90, CD105 y CD73, hematopoyéticos CD34 y CD45 y de pluripotencia OCT4 y NANOG fue realizada por medio de PCR-cuantitativo (Q-PCR) y citometría de flujo. El protocolo 1 de diferenciación neurogénica consistió en una pre-inducción neuronal por 24 horas con medio DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) y una posterior inducción neuronal con Betamercaptoetanol (BME) durante 6 días. El protocolo 2 de diferenciación neurogénica consistió en medio DMEM suplementado con Fibroblast Growth Factor-básico (bFGF), Epidermal Growth Factor (EGF) durante 24 horas y posteriormente durante 120 horas con medio de cultivo suplementado con hidroxianisol butilado (BHA), cloruro de potasio, ácido valproico, forskolina y suplemento neuronal. Muestras celulares fueron obtenidas a las 0, 24, 96 y 144 horas de cultivo. La expresión de genes fue evaluada por Q-PCR e inmunofluorescencia. Los análisis de Q-PCR en CMM indiferenciadas, detectaron mayores ( $P < 0,05$ ) niveles de mRNA de marcadores mesenquimáticos *CD73*, *CD90* y *CD105* en relación a los niveles de *CD34* (151.2, 245.1 y 238.1 veces, respectivamente). Mediante citometría de flujo se determinó una alta proporción de CMM positivas para marcadores

mesenquimáticos CD29 (76,3%), CD73 (96,8%) y marcadores de pluripotencia Oct4 (94,6%) y Nanog (88,4%). En contraste, una alta proporción de CMM fue negativa para marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (93,4% y 95,6%, respectivamente). Durante el el protocolo 1 de diferenciación neuronal se detectó una disminución ( $P < 0,05$ ) de los niveles de mRNA de *NESTIN* a las 24, 96 y 144 horas (3,7; 2 y 1 veces expresión de la hora 0). En comparación, los niveles de mRNA de *MAP2* aumentaron ( $P < 0,05$ ) a las 24, 96 y 144 horas (2,4; 18,9 y 16 veces expresión de la hora 0). Los niveles de mRNA de *TRKA* aumentaron ( $P < 0,05$ ) a las 96 y 144 horas (6,6 y 8 veces expresión de la hora 0). En tanto los niveles de mRNA de *NGF* y de *NANOG* no fueron distintos entre el grupo control y diferenciación. Durante el protocolo 2 se detectó una disminución ( $P < 0,05$ ) de los niveles de mRNA de *NESTIN* a las 24, 96 y 144 horas (3,74; 0,3; 0,1 veces expresión de la hora 0). En comparación, la expresión de *MAP2* aumentó ( $P < 0,05$ ) a las 96 y 144 horas (4,1; 22,8 veces expresión de la hora 0). Asimismo, los niveles de *TRKA* aumentaron ( $P < 0,05$ ) luego de 96 y 144 horas (51,3; 111,7 veces expresión de la hora 0) de diferenciación. Además, *NGF* presentó un menor nivel de expresión en las CMM diferenciadas a las 0, 24, 96 y 144 horas de cultivo (1; 0,8; 16,2 y 17,4 veces la expresión de la hora 0), en comparación con el control (1; 5,8; 47,8 y 25,7 veces la expresión de la hora 0), respectivamente. El perfil de expresión relativa de genes obtenido en el protocolo 2 es concordante con el obtenido en el ensayo de inmunofluorescencia asociada a *NESTIN*, *MAP2*, *TRKA* y PrP<sup>C</sup>. A pesar de que las CMM expuestas a BME presentan cambios morfológicos similares a un perfil neuronal, los valores de expresión génica no indican la adopción de un fenotipo neurogénico. Como ha sido reportado previamente, estos cambios pueden deberse a efectos citotóxicos del BME más que a inducción neurogénica. Sin embargo, el protocolo 2 utilizado en este estudio indujo cambios morfológicos y un perfil de expresión génica asociado a diferenciación neurogénica. En conclusión, las CMM de origen fetal bovino

indiferenciadas poseen mayoritariamente un perfil mesenquimático y bajo condiciones de cultivo in vitro adecuadas poseen un potencial de diferenciación neurogénica.

## **SUMMARY**

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent progenitor cells that possess the potential for self-renewal and multilineage differentiation (osteogenic, chondrogenic and adipogenic). Despite MSC have been isolated from several tissues, the most common source of isolation is the bone marrow (BM), both for clinical and research purposes. The differentiation capacity of MSC extends primarily to mesodermal lineages; however, recent studies have shown that MSC have also the potential to differentiate into ectodermal cell types such as neuronal. The aim of this study was to determine the potential for *in vitro* neurogenic differentiation of MSC isolated from fetal bovine BM. Detection of mesenchymal markers CD90, CD105 and CD73, hematopoietic markers CD34 and CD45 was performed by Quantitative-PCR (Q-PCR) and flow cytometry. Protocol 1 of neurogenic differentiation consisted in pre-induction for 24 hours with DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), and induction with beta-mercaptoethanol (BME) for 6 days. Protocol 2 of neurogenic differentiation consisted in culture of MSC in DMEM supplemented with Fibroblast Growth Factor-basic (FGFb) and Epidermal Growth Factor (EGF) for 24 hours, followed by culture in DMEM supplemented with butylated hydroxyanisole, KCl, valproic acid, forskolin, neural supplement for 120 hours. Cell samples were taken at 0, 24, 96 and 144 hours of culture. Analyses indicated that mRNA levels of mesenchymal markers *CD73*, *CD90* and *CD105* were higher (151.2, 245.1 and 238.1 fold, respectively;  $P < 0.05$ ) relative to *CD34*. Moreover, flow cytometry detected a high proportion of MSC positive for mesenchymal markers CD29 (76.3%), CD73 (96.8%), pluripotent markers Oct4 (94.6%) and Nanog (88.4%). In contrast, high proportion of MSC were negative to hematopoietic markers CD34 and CD45 (93.4% and 95.6%, respectively). During protocol 1 of neuronal differentiation, *NESTIN* mRNA levels decreased

( $P < 0.05$ ) at 24, 96 and 144 hours (3,7; 2 and 1 fold 0 hours). In contrast, levels of mRNA of *MAP2* increased ( $P < 0.05$ ) at 24, 96 and 144 hours (2,4; 18,9 and 16 fold 0 hours). Similarly, levels of *TRKA* mRNA increased ( $P < 0.05$ ) at 96 and 144 hours (6,6 and 8 fold 0 hours). *NGF* and *NANOG* mRNA levels were not significantly different between treatments. During protocol 2, *NESTIN* mRNA levels decreased ( $P < 0.05$ ) at 24, 96 and 144 hours (3.74, 0.3, 0.1 fold 0 hours). In comparison, *MAP2* mRNA levels increased ( $P < 0.05$ ) at 96 and 144 hours (4,1; 22,8 fold 0 hours). In addition, *NGF* mRNA levels were lower ( $P < 0,05$ ) in differentiated MSC at 0, 24, 96 and 144 hours of culture (1; 0.8; 16.2 and 17.4 fold the expression at 0 hours) compared to control (1; 5.8; 47.8 and 25.7 fold 0 hours). The gene relative expression values in differentiated MSC were consistent with immunofluorescence patterns. Although BME induced neuron-like changes in MSC morphology, gene expression profiles showed no indication of the adoption of a neurogenic phenotype. As reported before, BME-induced morphological changes may be due to cytotoxic effects rather than neurogenic induction. However, the second protocol induced morphologic changes and a gene expression pattern associated to neurogenic differentiation. In conclusion, undifferentiated MSC isolated from fetal bovine BM possess a mesenchymal profile and under adequate *in vitro* culture conditions may be induced into neurogenic differentiation.

# 1 INTRODUCCIÓN

Las CMM son células progenitoras multipotentes con potenciales de auto-renovación y diferenciación multilínea (Pittenger et al., 1999). Su ubicación más conocida es en médula ósea (MO), donde representan entre un 0.001- 0,01% del total de la fracción celular (Pittenger et al., 1999). Adicionalmente se reporta la presencia de las CMM en otros tejidos como adiposo, cordón umbilical, músculo y pulpa dentaria (Kern et al., 2006). La capacidad de diferenciación de las CMM se extiende principalmente a linajes mesodérmicos como osteogénico, condrogénico y adipogénico (Bosnakovski et al., 2004; Cortes et al., 2013) Sin embargo, estudios recientes *in vitro* han demostrado que las CMM poseen además capacidad para diferenciarse hacia tejidos ectodérmicos como el neuronal (Khang et al., 2012; Tondreau et al., 2004). En este sentido se ha reportado que en cultivos *in vitro* de CMM expuestas a factores inductores de diferenciación neurogénica como  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), hidroxibutilanisol (BHA), cloruro de potasio (KCl), ácido valproico y forskolina, se detecta un aumento en la expresión de genes o marcadores neuronales (Woodbury et al., 2000). Entre estos marcadores se ha detectado la expresión de NESTIN, cuya expresión está asociada a actividad citoplasmática en células progenitoras neuronales, en las cuales cumple una función de reorganización de microtúbulos durante el desarrollo neurogénico (Michalczyk and Ziman, 2005). Además, se ha detectado la expresión de marcadores de maduración neural como proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) presente en procesos de neuritogénesis (Tondreau et al., 2004). Dentro de los marcadores de maduración, también se ha reportado la expresión del receptor tirosina kinasa A (TrKA), que cumple un rol como receptor de superficie del factor de crecimiento neural (NGF) (Zhang et al., 2000). Adicionalmente, existen estudios de diferenciación neuronal en células madre embrionarias (CME) que han reportado un aumento en la expresión del gen del prion celular (PrPC), cuya

función durante este proceso es desconocida pero se presume que está asociada al control del estado pluripotente (Mouillet-Richard et al., 1999).

El potencial de diferenciación neurogénica de las CMM abre nuevas posibilidades de utilización de estas células en medicina regenerativa, así como también en el desarrollo de modelos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, previamente a su aplicación, es imprescindible contar con más información que permita dilucidar su biología, incluyendo sus características bajo cultivo *in vitro*. Las CMM son células indiferenciadas que han sido aisladas y estudiadas principalmente en el modelo murino y humano y en menor medida en especies domésticas como caninos, felinos, equinos y porcinos (Juhásová et al., 2011; Kadiyala et al., 1997; Radcliffe et al., 2010). A pesar de su utilidad como modelo para la investigación, en la actualidad existe escasa información sobre la biología de estas células en la especie bovina. El desarrollo de un modelo experimental en animales mayores incluyendo la especie bovina puede ofrecer nuevas alternativas para la investigación en la biología de las CMM y eventualmente para aplicaciones en medicina regenerativa y como modelo *in vitro* para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la Encefalopatía Espongiforme Bovina. Por otra parte, la amplia disponibilidad de tejidos provenientes desde plantas faenadoras al ser esta una especie de abasto, permite disminuir la necesidad de recurrir a métodos de extracción invasivos en donantes vivos. El objetivo del presente estudio fue el aislamiento de CMM bovinas desde médula ósea fetal bovina y su posterior caracterización durante el proceso de diferenciación neurogénica *in vitro* mediante análisis cuantitativo y cualitativo.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biología de las células madre mesenquimales (CMM)

Las CMM también llamadas células madre estromales poseen propiedades multipotenciales que incluyen capacidad de autorenovación y diferenciación multilínea (Platet et al., 2004). Tradicionalmente se ha establecido que las CMM son células progenitoras mesenquimales con capacidad de diferenciación hacia linajes de origen mesodérmico (Mendes et al., 2005). Dentro de estos linajes se incluyen los tipos celulares osteogénico, adipogénico, condrogénico y miogénico (Bossolasco et al., 2004; Pittenger et al., 1999). Sin embargo, estudios recientes han demostrado el potencial de diferenciación de las CMM hacia linaje endodérmico como el hepático y hacia linaje ectodérmico como el neural (Kopen et al., 1999; Petersen et al., 1999).

Hace aproximadamente cuatro décadas se reportó el primer estudio descriptivo sobre las propiedades de CMM aisladas desde MO adulta en ratas (Friedenstein et al., 1966). Las propiedades de estas células incluían capacidad de adherencia al plástico, morfología fibroblastoide y capacidad clonogénica o de formación de colonias. Adicionalmente, se reportó como potencial fundamental de estas células, su capacidad de diferenciación multilínea (Pittenger et al., 1999). En el último tiempo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), ha propuesto adicionalmente tres requisitos para la clasificación de CMM que incluyen: 1) Adherencia a placas de cultivo de plástico y morfología fibroblastoide; 2) Inmunofenotipo positivo a CD44, CD73, CD90, CD105 y HLA-I y negativo a marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45; y 3) Capacidad de diferenciación multilínea hacia tipos celulares de origen mesodérmico que incluyen osteogénico, condrogénico y adipogénico (Dominici et al., 2006).

La MO es el tejido de aislamiento de CMM más frecuentemente utilizado y reportado (Cortes et al., 2013), debido a su amplia disponibilidad y a su facilidad de muestreo. A pesar de que sólo el 0.001 – 0.01% del número total de células nucleadas presentes en este tejido son CMM (Pittenger et al., 1999), el aislamiento desde MO posee una alta eficiencia y las células derivadas cuentan con una notable capacidad de diferenciación (Pittenger et al., 1999). Adicionalmente, el aislamiento de CMM desde tejido adiposo ha sido posible y cuyas CMM presentan propiedades similares a las obtenidas desde MO (Kern et al., 2006). Además, las CMM de sangre de cordón umbilical cuentan con características morfológicas celulares similares a las obtenidas de MO pero poseen menor capacidad de diferenciación hacia el linaje adipogénico (Kern et al., 2006). Otros tejidos desde los cuales se han aislado CMM son placenta, periostio, membrana sinovial, músculo, dermis, sangre y hueso trabecular (Battula et al., 2007; Tuan et al., 2002). Según ensayos de transcriptómica y ensayos de diferenciación *in vivo* se ha propuesto que las potencialidades de diferenciación entre CMM obtenidas desde distintas fuentes son variables y dependen del origen y de la metodología experimental (Sacchetti et al., 2016).

La heterogeneidad celular presente en los tejidos de origen, hace necesaria la utilización de métodos de separación y aislamiento de las CMM. Entre algunos métodos reportados se encuentra la citometría de flujo, las esferas inmunomagnéticas y la adherencia a placas de cultivo de plástico. La utilización del citómetro de flujo para la caracterización e identificación de marcadores específicos unido a un sortometro para la separación de los diversos tipos celulares es actualmente un método de gran aceptación (Kozanoglu et al., 2009; Martins et al., 2009). Este método permite el reconocimiento de las CMM mediante su marcaje con un fluorocromo asociado a anticuerpos específicos contra marcadores de superficie mesenquimales como CD105, CD90, CD73 para selección positiva y complementariamente por ausencia de la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD45 y CD34 en el caso de selección

negativa (Hombach-Klonisch et al., 2008). El fluorocromo es excitado por un haz de láser que permite recoger información sobre la morfología, composición de proteínas de superficie y contenido de ADN de las células. Una vez reconocidas, las CMM pueden ser posteriormente separadas del resto de las células mediante la utilización de un sortómetro (Hombach-Klonisch et al., 2008). La ISCT ha propuesto, mediante la utilización de citometría de flujo, como criterio mínimo para la definición de un cultivo de CMM humanas, que su población celular posea >95% de células positivas a marcadores de superficie mesenquimales (CD105, CD90 y CD73) y <2% de células positivas a marcadores de superficie hematopoyéticos (CD45, CD34 y CD14) (Dominici et al., 2006). Un método alternativo para el aislamiento de CMM lo constituye la selección celular por medio de esferas inmunomagnéticas. Este método consiste en la unión selectiva de las células a partículas magnéticas portadoras de anticuerpos específicos de marcadores de superficie mesenquimales o hematopoyéticos (Chung et al., 2009). El aislamiento celular puede lograrse por la selección de marcadores de superficie positivos (CD105, CD90, CD73) o negativos (CD43, CD34) según sea las necesidades requeridas. La utilización de esta técnica no causa alteraciones evidentes sobre la biología celular de la muestra en estudio (Hombach-Klonisch et al., 2008). Sin embargo, la técnica más utilizada para el aislamiento de CMM es la adherencia diferencial de las CMM a placas de cultivo de plástico. Las CMM poseen capacidad de adherencia al plástico debido a la presencia de proteínas de superficie celular tales como integrinas, fibronectina, colágeno (tipo I, III, IV), laminina, hialuron y proteoglicanos (Docheva et al., 2007). La adhesión celular se relaciona con la interacción entre proteínas de adhesión y la superficie de cultivo, proceso en el cual influyen características como el pH, temperatura del medio y propiedades físico químicas como las fuerzas de van der Waals (Docheva et al., 2007). Por otro lado, esta técnica de selección celular puede llegar a tener limitantes como la presencia de células contaminantes dentro de las células adherentes.

Además, a medida que aumenta el tiempo de cultivo en placas plásticas, las CMM disminuyen el potencial de diferenciación y su habilidad proliferativa (Mabuchi et al., 2013). De igual forma, las CMM cultivadas prolongadamente en este tipo de placas se predisponen a adquirir anormalidades cromosómicas junto con cambios en la expresión de marcadores de superficie típicos de CMM (Mabuchi et al., 2013).

### **Marcadores mesenquimales**

La identificación inmunofenotípica de proteínas presentes en membrana celular de las CMM como CD105, CD90 y CD73 y la identificación por descarte de marcadores de linaje hematopoyético como CD34 y CD45 se realiza como parte del proceso de caracterización celular. La proteína CD73 se encuentra unida a la membrana mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que actúa como catalizador de la desfosforilación extracelular de nucleótidos a nucleósidos (Airas and Sirpa, 1996). Por su parte, CD90 es una proteína perteneciente al grupo de las inmunoglobulinas, también anclada al lado externo de la membrana celular por medio de un GPI (Haeryfar and Hoskin, 2004). A pesar de que la función de CD90 aún no ha sido determinada, se ha propuesto su participación en procesos de reconocimiento, adhesión, proliferación y migración de fibroblastos (Haeryfar and Hoskin, 2004). CD105 es una glicoproteína presente en la membrana celular como receptor de la citoquina factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y su función se ha relacionado con la proliferación y migración celular (Fonsatti and MAIO, 2004).. Además, CD105 ha sido implicada en la regulación de componentes de matriz extracelular como fibronectina, colágeno y como inhibidor del activador del Plasminogeno 1 (PAI-1) (Fonsatti and MAIO, 2004). Dentro de los marcadores hematopoyéticos, CD34 es una proteína transmembrana de la familia de las Sialomucinas, utilizada ampliamente como marcador para la identificación de células madre hematopoyéticas (Furness and Mcnacny, 2006). La función de

esta proteína no ha sido claramente dilucidada pero se ha propuesto un rol en la promoción de la proliferación celular, además del bloqueo de procesos de diferenciación en las células progenitoras y de la adhesión celular (Nielsen and McNagny, 2008). Por su parte CD45 es una glicoproteína de transmembrana con peso molecular de 180-220 kDa, que se expresa en todas las células hematopoyéticas (Altin and Sloan, 1997). Esta proteína está presente desde la maduración de células linfohematopoyéticas hasta su estado adulto. Además, posee actividad tirosina fosfatasa regulando procesos de transducción de señales por medio de receptores de linfocitos T, afectando el proceso de diferenciación celular (Hendrickx and Bossuyt, 2001).

## **2.2 Células madre mesenquimales en la especie bovina**

Los modelos animales son de gran utilidad para el estudio de la biología de CMM e investigación en terapias celulares y regenerativas tanto para medicina humana como veterinaria. Se ha descrito ampliamente el aislamiento de CMM desde varias especies animales como la murina (Soleimani and Nadri, 2009), equina (Radcliffe et al., 2010), canina (Kadiyala et al., 1997), lagomorfa (Wakitani et al., 1994) y porcina (Juhásová et al., 2011). Recientemente se han incluido modelos animales como el bovino, lo que ha permitido agregar a esta especie como un nuevo modelo para la investigación en CMM (Bosnakovski et al., 2004; Calloni et al., 2014; Cortes et al., 2013; Donofrio et al., 2005). La amplia disponibilidad de tejidos, la facilidad de aislamiento y el potencial de diferenciación de las CMM provenientes de MO hace que la especie bovina se convierta en una alternativa para profundizar la investigación sobre la biología de CMM. Esto con el fin de ser utilizado como modelo de diferenciación celular para el estudio de procesos fisiológicos productivos y patológicos que puedan estar vinculados a esta especie. Las CMM aisladas desde MO bovina poseen capacidad de diferenciación hacia linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico, demostrándose así su potencial multipotente similar al de especies

como la murina, felina, porcina y humana (Bosnakovski et al., 2005; Cortes et al., 2013; Diaz et al., 2015; Dueñas et al., 2014).

El aislamiento de CMM desde la médula ósea en el modelo bovino se ha realizado en distintos estados de desarrollo que incluyen las etapas fetal, juvenil y adulta (Bosnakovski et al., 2004; Cortes et al., 2013; Erickson et al., 2011). Estudios recientes han demostrado que la inducción de diferenciación condrogénica *in vitro* de CMM genera un aumento progresivo en el contenido de ADN en directa relación al aumento de la edad del animal del cual proviene la muestra (Erickson et al., 2011), En contraposición, esta relación es inversa en cuanto a la capacidad de formación de matriz de cartílago a medida que aumenta la edad del animal (Erickson et al., 2011). Adicionalmente, se ha reportado la obtención de CMM bovinas desde sangre de cordón umbilical, cuyas características fenotípicas y genotípicas son similares a las células procedentes de MO bovina (Raoufi et al., 2011). Los distintos procesos de diferenciación hacia linajes de origen mesodérmico han demostrado el potencial multipotente que poseen las CMM bovinas. La inducción de procesos de mineralización en células diferenciadas hacia linaje osteogénico demuestra la capacidad de las células para adquirir características morfológicas y expresar marcadores típicos de este linaje celular (Bosnakovski et al., 2004; Cortes et al., 2013). Del mismo modo, la expresión relativa de marcadores típicos de linajes condrogénico como SOX9, COL2A1, Aggrecan y Colágeno tipo II, indican el inicio y mantención del estado de diferenciación condrogénica (Bosnakovski et al., 2006, 2004; Cortes et al., 2013). Así mismo, la diferenciación adipogénica ha sido evidenciada por la presencia de vacuolas lipídicas en el citoplasma junto con expresión de marcadores de origen adipogénico como AP-2 (Proteína ligante de ácidos grasos) y PPAR $\gamma$  (Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomícos Gamma) (Bosnakovski et al., 2005; Cortes et al., 2013). Estos resultados demuestran la capacidad de las CMM bovinas cultivadas e inducidas a diferenciación bajo condiciones *in vitro* para adquirir características de tejidos

de origen mesodérmico. La posible inclusión de CMM bovinas a procesos de diferenciación hacia linajes de origen ecdodérmico como el neuronal, abre las expectativas sobre su utilización para el estudio de enfermedades neurodegenerativas en esta especie como es el caso de la Encefalopatía Espongiforme Bovina. Esta enfermedad es causada por una proteína patógena conocida como Prion Scrapie (PrPSc) y originada por un cambio conformacional de la estructura nativa de la proteína prion celular (PrPC). La EBB se caracteriza por presentar lesiones neurodegenerativas a nivel de sistema nervioso del bovino (Wells and Wilesmith, 1995). El desarrollo de cultivos *in vitro* de diferenciación neurogénica permitiría estudiar tanto la expresión de PrPC como potencialmente la capacidad de infección de PrPSc durante la neurogénesis bovina.

### **2.3 Diferenciación neurogénica**

La inducción de diferenciación neuronal de CMM bajo condiciones *in vitro* ha sido reportada en varias especies incluyendo la humana (Tondreau et al., 2004), murina (Khang et al., 2012; Woodbury et al., 2000) y porcina (Kumar et al., 2012). Se han descrito una serie de factores que actúan como inductores del proceso de diferenciación neurogénica en CMM, entre los que se incluyen el  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), hidroxibutilanisol (BHA), cloruro de potasio (KCl), ácido valproico y forkolina (Woodbury et al., 2000). El cultivo de CMM en presencia de estos agentes químicos induce cambios morfológicos y moleculares caracterizados por un aumento la expresión de marcadores neuronales como MAP-2 y TRKA (Liu et al., 2013; Tondreau et al., 2004; Woodbury et al., 2000).

El BME actúa como agente antioxidante protegiendo a las células de la muerte celular e incrementando la secreción del neurotransmisor acetil colina transferasa (ChTA) desde células en proceso de diferenciación neuronal (Ni et

al., 2001). Así mismo, se ha reportado su efecto como potenciador metabólico de actividad mitocondrial (Ishii et al., 1993). La inducción de diferenciación neuronal con BME produce una rápida transición de las células hacia una morfología neuronal caracterizada por la formación de filamentos intermedios (Neurofilamentos) y la generación de neuritas (Woodbury et al., 2000). Sin embargo, el rol que ejerce el BME como factor de diferenciación neuronal sobre cultivos de CMM no ha sido totalmente dilucidado (Ishii et al., 1993). La actividad de BHA es conocida por su capacidad antioxidante, aunque se han reportado efectos tóxicos sobre los cultivos celulares, es por esto que previamente a su utilización es necesaria la determinación de una dosis previa que no genere genotoxicidad en las células (Williams et al., 1990). Existen reportes que indican que el efecto neurogénico de BHA no sería efectivo y que la inducción de morfología neuronal sería consecuencia de la desestabilización de microtúbulos a nivel citoplasmático como consecuencia de un efecto tóxico (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004).

Por su parte el KCl es un importante componente que participa en la mantención de la despolarización celular conjuntamente con altos niveles intracelulares de calcio y cAMP (Hansen et al., 2003). La diferenciación de las células neuronales puede ser inducida por un aumento en las concentraciones intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) o calcio. cAMP y calcio a su vez activan vías de señalización específicas, que en última instancia conducen a la activación de factores de transcripción y genes que participan en el proceso de diferenciación (Hansen et al., 2000). Por lo tanto, el efecto de KCL potencia la diferenciación celular por medio de la acción de Forskolina a través de la activación de la vía de señalización de la proteína kinasa A y la regulación de kinasa extracelular, las que promueven el proceso de neuritogenesis (Hansen et al., 2003). Por otra parte, el ácido valproico es un ácido graso de cadena corta implicado recientemente en el crecimiento y la diferenciación celular (Kuendgen et al., 2004). El ácido valproico juega un rol

regulatorio en el remodelamiento de cromatina y transcripción génica (Kuendgen et al., 2004). Esta actividad la realiza mediante la inhibición de histonas diacetiladas, permitiendo la transcripción génica necesaria para el desarrollo de astrocitos y la diferenciación neuronal (Kim et al., 2007).

Además de los factores de inducción anteriormente descritos, se ha reportado la suplementación combinada de factores que potencian la división celular como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Tao et al., 2005; Woodbury et al., 2000). bFGF fue utilizado como parte de un medio de cultivo utilizado en la primera parte del proceso de diferenciación neuronal (Tatard et al., 2007). El bFGF estimula la mantención del potencial de progenitores neuronales multipotenciales celulares, induciendo la formación de neuronas de tipo GABA energicas (Bithell et al., 2008). Del mismo modo bFGF promueve la proliferación y diferenciación celular activando el transporte de mRNA y aumentando la síntesis de proteínas, como también promoviendo el nivel de respuesta de las células al tratamiento de inducción neuronal y aumentando los niveles de expresión del gen marcador de precursores neuronales NESTIN (Delcroix et al., 2010). Por otra parte, se ha reportado que EGF promueve la maduración de células gliales e induce el proceso de neuritogénesis (Reynolds et al., 1992). En cultivos celulares suplementados con EGF, las células progenitoras embrionarias adquieren morfología neuronal y presentan inmunoreactividad a neurotransmisores del estado adulto GABA y a metionina encefálica (Reynolds et al., 1992). Se ha demostrado que la introducción de bFGF y EGF en la pre-inducción de diferenciación neuronal de CMM incrementa hasta un 50% la respuesta de estas células a la inducción neuronal (Woodbury et al., 2000). La exposición de CMM a factores químicos de inducción de diferenciación celular neuronal induce la formación de cambios morfológicos que incluyen la retracción del citoplasma celular hacia el núcleo y la formación de cuerpos celulares,

mostrando morfologías neuronales bipolares y ampliamente ramificadas (Kermani et al., 2008; Ni et al., 2001).

### **Marcadores de diferenciación neurogénica**

La presencia de factores inductores de diferenciación neurogénica en el medio de cultivo aumenta la expresión de marcadores de maduración y diferenciación neuronal. Dentro de los marcadores neuronales más utilizados en experimentos de diferenciación neurogénica encontramos a NESTIN, MAP-2, NGF, TrKA y PrPC (Woodbury et al., 2000). NESTIN es una proteína que se encuentra presente en filamentos intermedios del citoesqueleto principalmente durante la división de células progenitoras que se encuentran en desarrollo y regeneración de tejidos (Park et al., 2010). Durante la mitosis celular, NESTIN promueve la fosforilación de Vimentina, proteína que conforma los filamentos intermedios (Michalczyk and Ziman, 2005). La ausencia de Vimentina en el estado mitótico celular facilita el transporte de proteínas precursoras en la reorganización celular por parte de los microtúbulos (Michalczyk and Ziman, 2005). Además, NESTIN está asociada al aumento de la actividad citoplasmática en células progenitoras que poseen una alta división y activación de interface, características presentes en células en estado inicial de desarrollo neural (Michalczyk y Ziman, 2005). Por consiguiente, NESTIN es empleado como marcador del estado de precursor neuronal en células madre multipotentes (Woodbury et al., 2000). En CMM humanas y de ratón, NESTIN está presente en altos niveles en las primeras horas de diferenciación pero a medida que aumenta el tiempo decrece su expresión hasta llegar a niveles no detectables luego de 6 días de cultivo (Ni et al., 2010; Woodbury et al., 2000).

Por su parte MAP-2 es una proteína asociada a la maduración neuronal, que está presente en los microtúbulos predominantemente de neuronas y participa activamente en la polimerización de tubulina (Kalcheva et al., 1995). Esta

proteína se presenta principalmente en microtúbulos de las dendritas neuronales, uniéndose a los dímeros de tubulina e inhibiendo su disociación y manteniendo así las prolongaciones celulares (Kalcheva et al., 1995). Además, debido a su activa participación en el ensamblaje de microtúbulos, función esencial de la neurogénesis, la expresión relativa de MAP-2 se muestra ausente en las primeras horas de cultivo de diferenciación celular, sin embargo, a medida que aumenta el tiempo del cultivo se incrementa su expresión (Tondreau et al., 2004). Esta regulación en su expresión corrobora así su activa participación en el proceso de maduración neuronal y mantención en la formación dendrítica en CMM expuestas a un proceso de diferenciación neuronal (Liu et al., 2013; Tondreau et al., 2004).

La expresión del receptor de superficie de membrana celular TrkA también ha sido reportada durante el proceso de diferenciación neuronal de CMM, teniendo un rol importante en el crecimiento neural mediante interacción extracelular con su ligando (NGF) (Zhang et al., 2000). El complejo receptor-ligando se internaliza por medio de vesículas de Clatrina, para posteriormente inducir la activación de receptores intrínsecos de actividad tirosina kinasa (Zhang et al., 2000). Este efecto de internalización es relevante en la respuesta de las neurotrofinas como NGF, requerido para la diferenciación y supervivencia neuronal (Zhang et al., 2000). NGF causa la dimerización y autofosforilación de TrkA, el cual activa la señalización de proteínas como fosfolipasa C, Shc (proteína adaptadora implicada en la señalización de receptores), sustrato receptor de factor de crecimiento fibroblástico-2 (FRS2) y fosfatidilinositol 3-kinasa, proteínas que promueven la actividad mitógena de la proteína kinasa y de esta forma el proceso de diferenciación celular (Geetha et al., 2013). Al ser éste un marcador de maduración fenotípica, TrkA es detectado desde las 6 horas post-inducción, manteniéndose hasta más de 6 días (Woodbury et al., 2000). Adicionalmente, se ha reportado un aumento de TrkA de hasta 100 veces en su expresión en células sometidas a inducción neuronal,

demostrándose así su activa participación en el proceso de maduración neuronal (Li et al., 2007). NGF pertenece a la familia de las neurotropinas, esenciales en la diferenciación y supervivencia del tejido neuronal simpático tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* (Chun and Patterson, 1977). Este factor ha sido caracterizado como un factor de crecimiento en poblaciones neuronales tanto en sistema nervioso periférico como central (Maisonpierre et al., 1990).

Por su parte, la proteína PrPC es una glicoproteína de membrana con un peso molecular aproximado de 33- 35 KDa que se expresa en gran variedad de tejidos, especialmente en el sistema nervioso (Mouillet-Richard et al., 1999). Existen reportes que indican la expresión de PrPC durante el desarrollo embrionario y fetal bovino principalmente en cerebro, médula espinal, ganglios y sistema nervioso periférico (Peralta et al., 2011). La función de esta proteína ha sido vinculada con la diferenciación neuronal y el mantenimiento de las funciones celulares neuronales (Mouillet-Richard et al., 1999). Estudios recientes han demostrado que los niveles celulares de PrPC se correlacionan con el proceso de diferenciación neuronal (Steele et al., 2005). Del mismo modo, el avance en el proceso de diferenciación neuronal se asocia a altos niveles de PrPC, con lo cual se sugiere un rol importante para esta proteína en este proceso (Steele et al., 2005; Peralta et al., 2011). Considerando el rol que cumple PrPC en la diferenciación neural de células madre embrionarias (Peralta et al., 2011) y su participación en la EEB (Pan et al., 1993), la diferenciación de las CMM *in vitro* en células neuronales provee un valioso modelo para el estudio de enfermedades priónicas. Es por esto que la realización de estudios que incluyan CMM de MO de fetos bovinos permitirán investigar más a fondo sobre la biología celular de estas células y evaluar su posible utilización como fuente de estudio y posible futura utilización en terapias regenerativas en Medicina Veterinaria.

### 3 OBJETIVOS

#### **Objetivo General**

Evaluar el potencial de diferenciación neurogénica *in vitro* de CMM derivadas desde MO fetal bovina.

#### **Objetivos específicos**

1. Aislar CMM desde MO fetal bovina y caracterizar los perfiles de expresión génica mesenquimal, hematopoyético y multipotente.
2. Caracterizar el proceso de diferenciación neurogénica de CMM bovinas por medio de la determinación de marcadores neuronales mediante análisis cuantitativo y cualitativo.
3. Comparar dos protocolos de diferenciación neurogénica de CMM bovinas por medio de la determinación de marcadores neuronales mediante análisis cuantitativo y cualitativo.

## 4 HIPÓTESIS

Estudios realizados bajo condiciones *in vitro* han reportado que las CMM poseen potencial de plasticidad o de diferenciación hacia linaje no mesenquimal, derivado de la capa germinal ectodérmica. En consecuencia, la exposición a factores inductores de diferenciación neurogénica bajo condiciones de cultivo *in vitro* induce tanto la pérdida del estado multipotente como la adquisición de un fenotipo celular neurogénico en CMM aisladas desde MO fetal bovina.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención de médula ósea

Los procedimientos experimentales han sido previamente aprobados por el comité asesor de bioética del Fondo de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). Este estudio se realizó en el Laboratorio de Células Madre del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las muestras de MO se obtuvieron desde fémures de fetos bovinos de aproximadamente 7 y 9 meses de gestación (n=7) provenientes de una planta faenadora. La recolección de las muestras medulares se realizó mediante aspiración medular desde la diáfisis femoral del neonato utilizando una aguja hipodérmica (18G) acoplada a una jeringa (10 mL) conteniendo 2 mL de medio de colección compuesto por medio DMEM alto en glucosa (Hyclone Laboratories, Utah, USA) suplementado con 1000 UI de Heparina, 100 µg/mL de Estreptomicina y 100 UI/mL de Penicilina. La muestra de MO fue transferida a tubos de polipropileno de 15 mL y centrifugada a 500 g durante 5 minutos en dos ocasiones en solución buffer fosfato pH 7,4 (PBS; Hyclone) y dos veces en medio de expansión compuesto por DMEM alto en glucosa (Hyclone), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone), 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina y 0,25 µg/mL de Anfotericina B. Posteriormente, el pellet se resuspendió en medio de expansión y el cultivo fue sembrado e incubado en placas Petri a 38,5°C bajo atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de dos días de cultivo las células no adherentes al plástico se removieron por medio de un lavado con PBS y con reemplazo del medio de cultivo. El medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días. Se realizaron pasajes de los cultivos de CMM al alcanzar un 80 a 90% de confluencia mediante remoción enzimática con Tripsina/EDTA al 0,25%.

## 5.2 Diferenciación Neurogénica

Luego de 3 a 5 pasajes, las CMM fueron sembradas a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Se utilizaron dos protocolos de diferenciación neurogénica con el objetivo de optimizar las condiciones de cultivo y de maximizar el proceso de diferenciación. El primer protocolo de diferenciación neurogénica (Protocolo 1) se inició con una pre-inducción neuronal, utilizando medio DMEM alto en glucosa suplementado con 20% de SFB, 1mM  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), Penicilina/Estreptomicina (100UI/mL y 100  $\mu$ g/mL respectivamente) y Anfotericina (2,5  $\mu$ g/mL) (Woodbury et al., 2000). Este medio fue removido a las 24 horas de iniciado el tratamiento y con posterior lavado de la placa con PBS. Luego de 24 horas, las células fueron expuestas a medio de cultivo para inducción neurogénica compuesto por DMEM alto en glucosa suplementado con 1 mM de BME, Penicilina/Estreptomicina (100UI/mL y 100  $\mu$ g/mL, respectivamente) y Anfotericina (2,5  $\mu$ g/mL). Las CMM fueron cultivadas en medio de inducción durante 6 días a 38°C con 5% de CO<sub>2</sub> bajo atmósfera humidificada. Se realizó cambio de medio cada 48 horas y se tomaron muestras a las 0, 24, 96 y 144 horas de cultivo. El segundo protocolo de diferenciación neurogénica (Protocolo 2) está constituido por medio de pre-inducción neuronal, compuesto por DMEM alto en glucosa suplementado con 20% de SFB, 10 ng/mL de bFGF, 20 ng/mL de EGF, Penicilina/Estreptomicina (100UI/mL y 100  $\mu$ g/mL, respectivamente) y Anfotericina (2,5  $\mu$ g/mL) (Tondreau et al., 2004). Este medio fue reemplazado a las 24 horas de tratamiento y el cultivo celular fue lavado con PBS. Posteriormente, se realizó el proceso de inducción neuronal mediante cultivo en medio de diferenciación compuesto por DMEM alto en glucosa suplementado con 200  $\mu$ M de hidroxibutilanisol (BHA), 25 mM KCl, 2 mM ácido valproico, 10  $\mu$ M forskolin, 1% de suplemento neuronal (N1), penicilina/estreptomicina (100UI/mL y 100  $\mu$ g/mL respectivamente) y anfotericina (2,5  $\mu$ g/mL). Las CMM

fueron cultivadas en medio de inducción por 6 días a 38°C con 5% de CO<sub>2</sub> bajo atmósfera humidificada. Se realizó cambio de medio cada 48 horas y fueron tomadas muestras a las 0, 24, 96 y 144 horas de cultivo.

### 5.3 PCR-Cuantitativo

Esta técnica se utilizó para cuantificar los niveles de ARNm de genes mesenquimales *CD90*, *CD105* y *CD73*, hematopoyéticos *CD34* y *CD45*, de diferenciación neurogénica *NESTIN*, *TRKA*, *MAP-2*, *NGF* y *PrPC*, de pluripotencia *NANOG* y endógeno *GAPDH* (Tabla 1). Las muestras celulares fueron fijadas en RLT Buffer con 1% de BME. El RNA total se aisló utilizando un “minikit” RNAeasy (QIAGEN Inc, CA, USA), y fue cuantificado por espectrofotometría. El cDNA se sintetizó y amplificó utilizando un “Kit” Brilliant II SYBR Green RT-PCR (Stratagene, CA, USA). Para la reacción de PCR se utilizó un “Kit” Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, La Joya, CA). Cada reacción de PCR contenía 12,5 µL de Master Mix, 200 nM de “primers”, 0,375 µL de tinción de referencia Rox, 2 µL de cDNA y un volumen de H<sub>2</sub>O hasta completar los 25 µL. La reacción fue cuantificada en un termociclador Step One (Applied Biosystems, California, USA). Los niveles de mRNA fueron cuantificados mediante el método de  $\Delta\Delta CT$ .

### 5.4 Inmunofluorescencia

La expresión de *NESTIN*, *MAP-2*, *TRKA* y *PrPC* fue determinada a las 0, 24, 96 y 144 horas en CMM diferenciadas. Las CMM fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% por 10 minutos, se lavaron con PBS dos veces y se almacenaron a 4°C en PBS hasta su procesamiento. Para el análisis de inmunofluorescencia, las CMM fueron lavadas 3 veces por 5 minutos en PBS y posteriormente permeabilizadas con Tritón al 1% (para detección de proteínas intracelulares *NESTIN*, *TRKA*). Luego las CMM se bloquearon con suero de

burro (SB) (Sigma-Aldrich) al 2,5% durante 30 minutos. Luego las CMM se incubaron con anticuerpo primario policlonal de cabra con reacción conjugada para bovino (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluido en SB al 1,5%, durante 12 horas a 4°C. Luego las CMM se lavaron 3 veces por 5 minutos en PBS. Posteriormente, el anticuerpo primario fue detectado por medio de incubación en anticuerpo secundario anti-cabra IgG conjugado con FITC (1:100) diluido en SB al 1,5%, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las CMM fueron lavadas 3 veces en PBS y se montaron bajo un cubreobjetos con medio de montaje con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, las muestras fueron observadas bajo fluorescencia en un microscopio digital (Olympus, Tokyo, Japan) y se tomaron microfotografías utilizando una cámara digital.

## **5.5 Citometría de flujo**

Este método se utilizó para medir la expresión de *CD34*, *CD73*, *CD29*, *OCT4* y *NANOG* en CMM indiferenciadas. Para este proceso las células se removieron desde las placas de cultivo por medio de incubación en una solución 5 mM de EDTA durante 10 minutos a 38°C. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas utilizando un Kit Foxp3 (ON) mediante incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos con movimiento constante. Luego las CMM fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2000 rpm y posteriormente incubadas en una solución de PBS con un 2% de suero normal de conejo. Luego las CMM fueron incubadas en una dilución 1:100 de anticuerpo primario policlonal de cabra (*CD34*, *CD73*, *OCT4* y *NANOG*, Santa Cruz Biotechnology) y monoclonal de ratón (*CD29*, Santa Cruz Biotechnology) durante 30 minutos en hielo y con agitación constante. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en 1,5 mL de PBS y se le añadió el anticuerpo secundario de burro anti-cabra o anti ratón (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:100 y se

incubó durante 30 minutos en hielo. Luego se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso del anticuerpo y el pellet fue resuspendido en 300  $\mu$ L de buffer de citometría. El proceso de citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo Facs Calibur BD, el cual dispone de línea láser de 488 nm (azul) y 633 nm (rojo) y detectores de fluorescencia. Las células pasan alineadas a través del haz de luz láser focalizado y la señal producida es procesada por detectores. Las señales posteriormente fueron analizadas por medio del programa Cellquest (San José, USA).

## **5.6 Análisis de Datos**

La expresión de genes de las cuatro repeticiones por cada protocolo de diferenciación fue analizada mediante el software Infostat (Cordoba, Argentina). Los datos se normalizaron a escala logarítmica en base 10 para los valores de normalidad y las medias para cada réplica se compararon mediante ANOVA de una vía. Los valores de expresión génica entre los días de cultivo y entre los tratamientos y controles se analizaron mediante la prueba de Duncan de comparación múltiple ( $P < 0,05$ ).

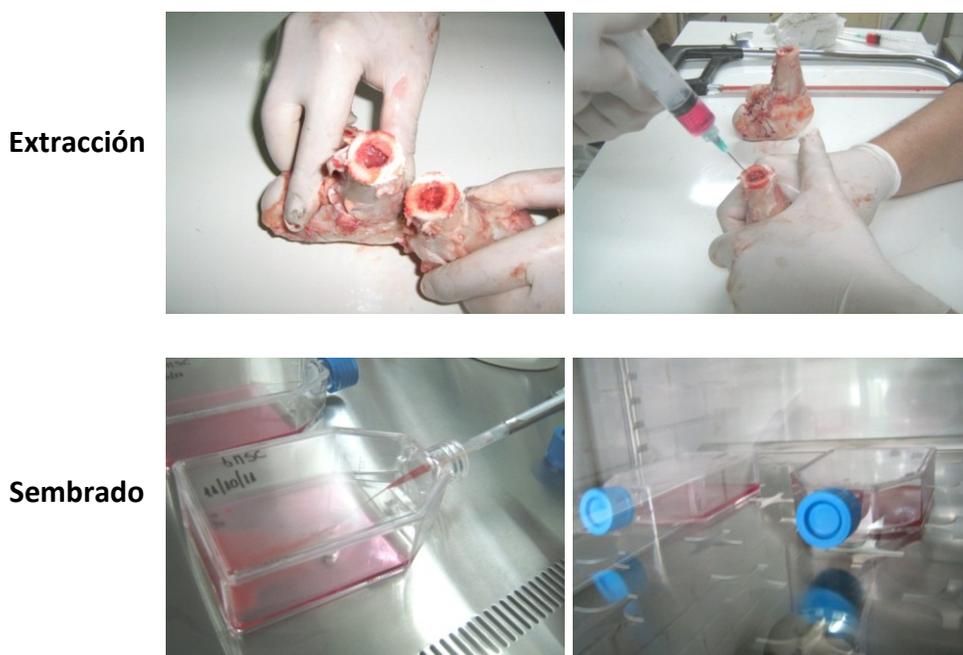
**Tabla 2.** Secuencia y número de acceso de primers utilizados para PCR- Cuantitativo

Gen		Secuencia	Numero de Acceso
<i>GAPDH</i>	Reverse	5' TGG AAGATGGT GATGGCCTTTCCATTG	NM_0010340 34
	Forward	5' CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	
<i>CD90</i>	Reverse	5'CACGTGTAGATCCCCTCATCCTT	NM_0010347 65.1
	Forward	5'CAGAATACAGCTCCCGAACCAA	
<i>CD105</i>	Reverse	5TGTTGTGGTTGGCCTCGATTA	NM_0010763 9.1
	Forward	5'CGGACAGTGACCGTGAAGTTG	
<i>CD73</i>	Reverse	5'GGGATGCTGCTGTTGAGAAGAA	NM_174129. 3
	Forward	5'TGGTCCAGGCCTATGCTTTTG	
<i>CD45</i>	Reverse	5'TCCGTCCTGGGTTTTATCCTG	NM_0052173 30.1
	Forward	5'CCTGGACACCACCTCAAAGCT	
<i>CD34</i>	Reverse	5'GATCAAGATGGCCAGCAGGAT	NM_174009. 1
	Forward	5'TGGGCATCGAGGACATCTCT	
<i>NANOG</i>	Reverse	5' GGGAATTGAAATACTTGACAG	NM_0010253 44.1
	Forward	5' GTGTTTGGTGA ACTCTCCTG	
<i>NESTIN</i>	Reverse	5'GAAAGGTTGGCACAGGTGTT	NM_0012065 91.1
	Forward	5'CTGGAGCAGGAGAAACAAGG	
<i>MAP2</i>	Reverse	5'AGACCTTGGCAGCCCCACACT	XM_0052027 06.1
	Forward	5'GAGGCATCCGCCCAACCACA	
<i>TrKA</i>	Reverse	5'CGCTCTCAGACACCTCCTTGAG	XM_0026859 65.3
	Forward	5'CTGGGTGAGGGTGCCTTT	
<i>NGF</i>	Reverse	5'ACCTCTCCCAGCACCATCAC	NM_0010993 62.1
	Forward	5'TCAACAGGACTCACAGGAGCAA	
<i>PrPC</i>	Reverse	5'AACCAGGATCCA ACTGCCTATG	NM_0012716 26.1
	Forward	5'CCAGAGACACAAATCCA ACTTGAG	

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Obtención de CMM desde medula ósea

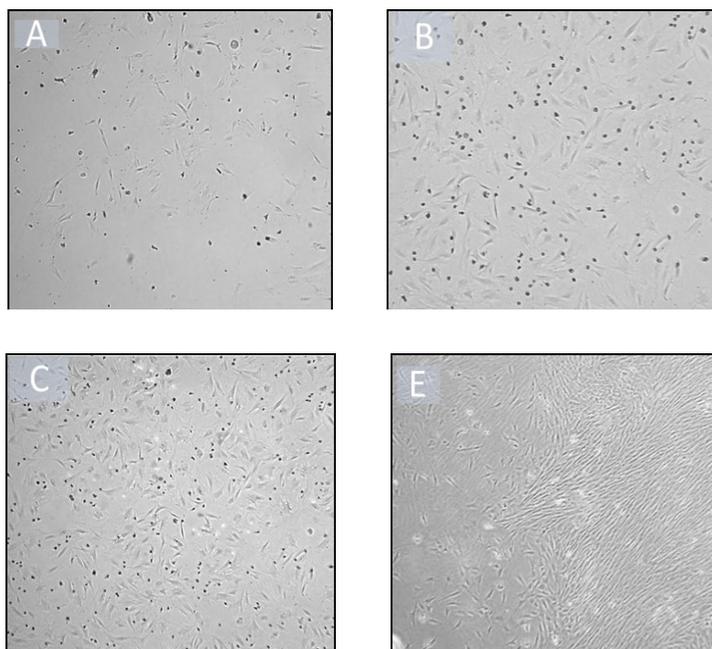
Las muestras de MO fueron obtenidas bajo condiciones asépticas desde fetos bovinos (n=7) de aproximadamente 7-9 meses de gestación. Se realizó la disección de los fémures, separando piel, capas musculares y tejido tendinoso. Posteriormente se realizó un corte transversal en el tercio medio del fémur para realizar la recolección de las muestras de MO (Figura 1) con aguja hipodérmica (18G) acoplada a una jeringa (10 mL) conteniendo medio de colección.



**Figura 1. Extracción de MO desde espacio medular del fémur fetal bovino.** Colección de MO mediante aspiración desde el espacio medular de fémur en su tercio medio mediante la utilización de una aguja hipodérmica (21G) acoplada a una jeringa (10 mL) conteniendo medio de colección. Proceso de sembrado y cultivo de CMM en frascos de cultivo bajo atmosfera controlada, 38°C con 5% de CO<sub>2</sub> en una atmosfera humidificada.

### 6.1.1 Expansión, fijación celular y doblaje celular

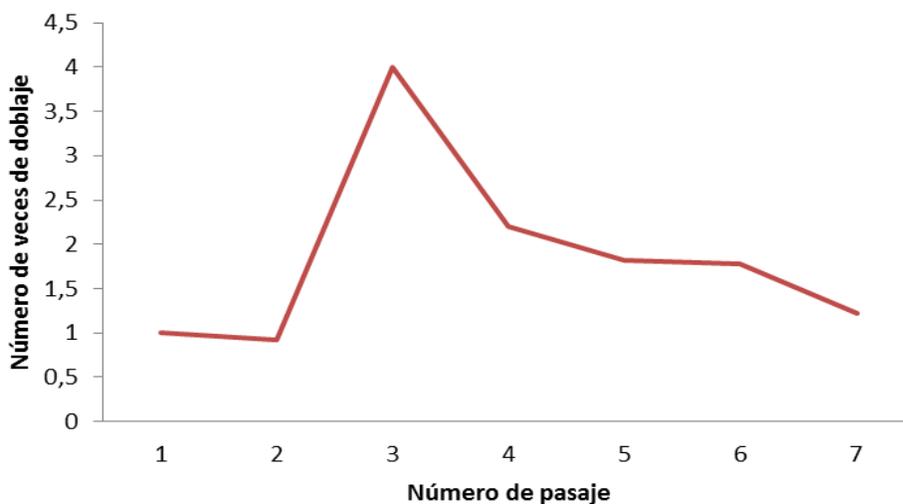
Al existir una gran diversidad de tipos celulares presentes en la MO, las CMM fueron aisladas en base a su propiedad de adherencia al plástico y evaluando su morfología fibroblastoide. En el extracto medular se pudo observar una gran cantidad de células hematopoyéticas, las cuales fueron removidas al realizar los cambios de medio de cultivo cada 2 días (Figura 1, C y D). Por su parte las CMM se adhirieron a las placas de cultivo de plástico, conformando una monocapa con morfología fibroblastoide alcanzando entre 80 y 90% de confluencia a medida que aumentaron los días de cultivo (Figura 2).



**Figura 2. Análisis morfológico de cultivo en monocapa de CMM durante el proceso de expansión y caracterización. Confluencia 30% (A), 50% (B), 80% (C) y 90-100% (D).**

Con la finalidad de evaluar la capacidad de proliferación de las células utilizadas para este ensayo, se realizó un análisis de doblaje celular (Figura 3). Durante este ensayo se observó que durante el pasaje uno y dos, solo se obtuvo un

índice de doblaje de 1 y 0.92 veces, respectivamente. El índice de doblaje más alto encontrado durante este ensayo se obtuvo al tercer pasaje donde se determinó un índice de doblaje de cuatro veces, en adelante desde el pasaje cuarto el índice de doblaje decrece consecutivamente hasta el pasaje siete (2.2, 1.8, 1.7, 1.2 respectivamente).

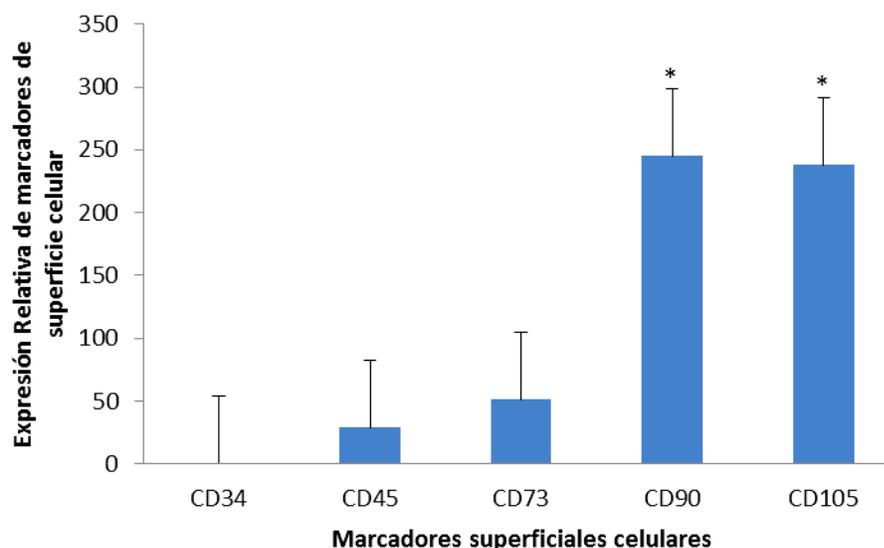


**Figura 3. Doblaje celular de CMM obtenidas desde medula ósea fetal bovina.** El mayor índice de doblaje ocurrió al pasaje tercero (4 veces), posteriormente el índice de doblaje decrece hasta el séptimo pasaje.

### 6.1.2 Caracterización del cultivo celular

Cultivos celulares independientes obtenidos desde tres muestras independientes de MO fetal bovina fueron analizados mediante Q-PCR para determinar los niveles de mRNA de los marcadores mesénquimales *CD73*, *CD90* y *CD105* y hematopoyéticos *CD34* y *CD45* mediante Q-PCR. En el análisis de expresión relativa de los marcadores superficiales hematopoyéticos dentro de la población celular adherente al plástico se determinó que los niveles de mRNA de *CD45* fueron 9 veces mayores comparado con *CD34* (Figura 4).

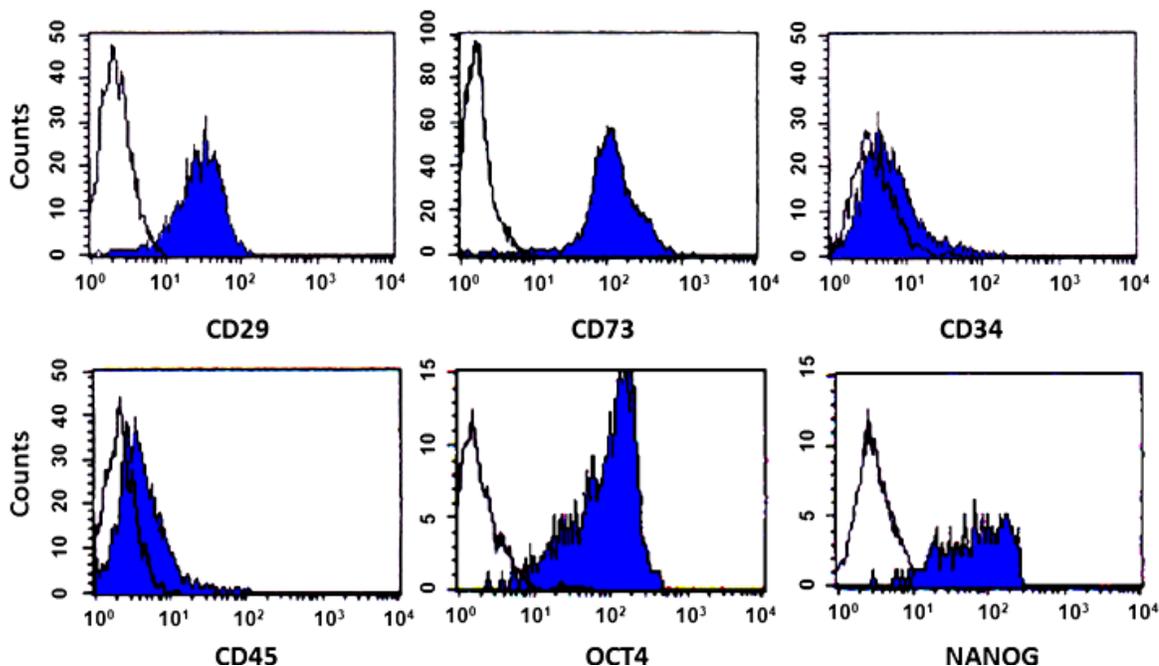
Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa entre estos valores. Los niveles de mRNA de marcadores de superficie de células mesenquimales en las células adherentes al plástico (Figura 4) *CD73*, *CD90* y *CD105* fue mayor (151,2, 245,1 y 238,1 veces, respectivamente;  $P < 0,05$ ) en relación a la expresión de *CD34*.



**Figura 4. Niveles de mRNA de marcadores superficiales mesenquimales y hematopoiéticos en población celular adherente al plástico extraída desde MO fetal bovina.** El marcador hematopoiético *CD34* fue asignado un valor de 1 y se determinó que los niveles de mRNA de *CD45* fueron 9 veces mayores en relación a *CD34*. Por su parte los niveles de mRNA de los marcadores mesenquimales, *CD73*, *CD90*, y *CD105* fueron 51,1; 245,1; y 238,1 veces mayor en relación a *CD34*. Superíndices (\*) representan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

El análisis de citometría de flujo realizado a las CMM indiferenciadas luego de 5 días de cultivo, determinó un alto porcentaje ( $P < 0,05$ ) de células positivas para marcadores mesenquimales *CD29* (76,3%) y *CD73* (96,8%), además de los marcadores de pluripotencia *OCT4* (94,6%) y *NANOG* (88,4%) (Figura 5). En

comparación, un alto porcentaje ( $P < 0,05$ ) de células fueron negativas a marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (93,4% y 95,6%, respectivamente).



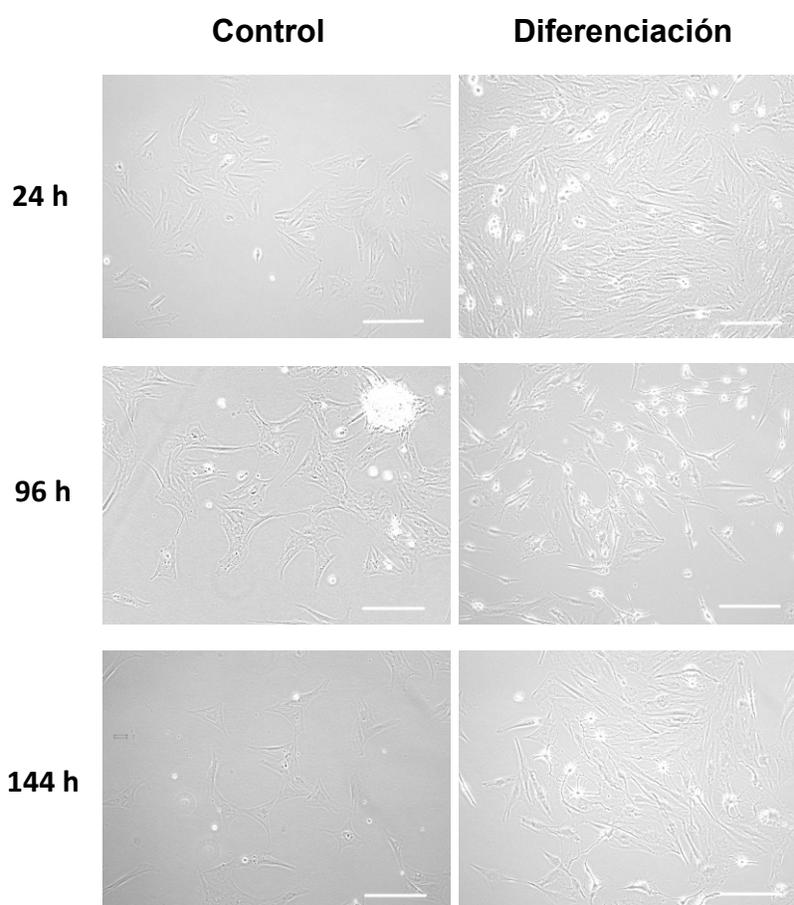
**Figura 5. Analisis de citometría de flujo de marcadores superficiales mesenquimales y hematopoyéticos en población celular adherente al plástico extraída desde MO fetal bovina.** La población celular adherente al plástico fue mayoritariamente negativa a marcadores hematopoyéticos, CD34 (93,4%), CD45 (95,6%), y positiva a marcadores mesenquimales, CD29 (76,3%) y CD73 (96,8%). Dicha población fue además mayoritariamente positiva a marcadores pluripotentes *OCT4* (94,6%) y *NANOG* (88,4%).

## 6.2 Diferenciación neurogénica

### 6.2.1 Protocolo 1

La evaluación de la morfología de las CMM cultivadas en presencia de factores inductores de diferenciación neurogénica del protocolo 1 fue realizada por medio de observación microscópica (Figura 6). Las CMM tratadas con medio de diferenciación indicado en el protocolo 1, mostraron notables cambios en su

morfología, destacándose la formación de elongaciones en los cuerpos celulares. El grupo celular con tratamiento no mostro cambios significativos en su morfología durante el periodo de pre-inducción (primeras 24 horas) pero se observó una disminución en el número de células adherentes. Al transcurrir las horas de cultivo y de diferenciación, un grupo de células fue dejando su morfología fibroblastoide e iniciando una retracción del cuerpo celular con formación de proyecciones.



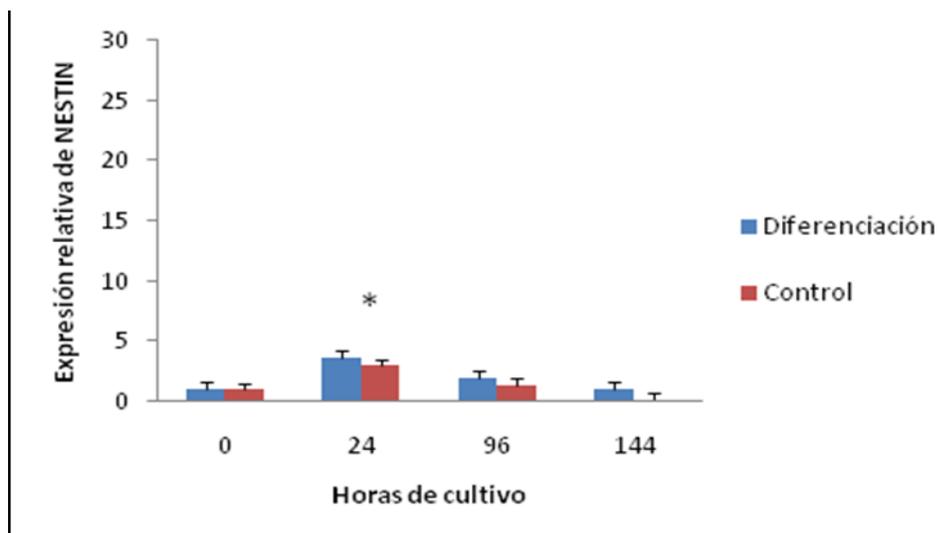
**Figura 6. Microfotografías de CMM expuestas a protocolo 1 de diferenciación neurogénica.** A las 24 h las CMM no muestran cambios significativos en su morfología. En 96 h se observa formación de proyecciones en el cuerpo celular. A las 144 h de cultivo se mantienen los cambios morfológicos con una marcada disminución en el número de células. Escala de barra: 500  $\mu$ m.

Es importante resaltar que no todas las células respondieron a la diferenciación celular ya que se observaron subpoblaciones celulares que mantuvieron su morfología fibroblastoide. En la etapa final del cultivo el número de células fue disminuyendo en forma considerable, sin embargo, las células existentes conservaban las características morfológicas anteriormente mencionadas.

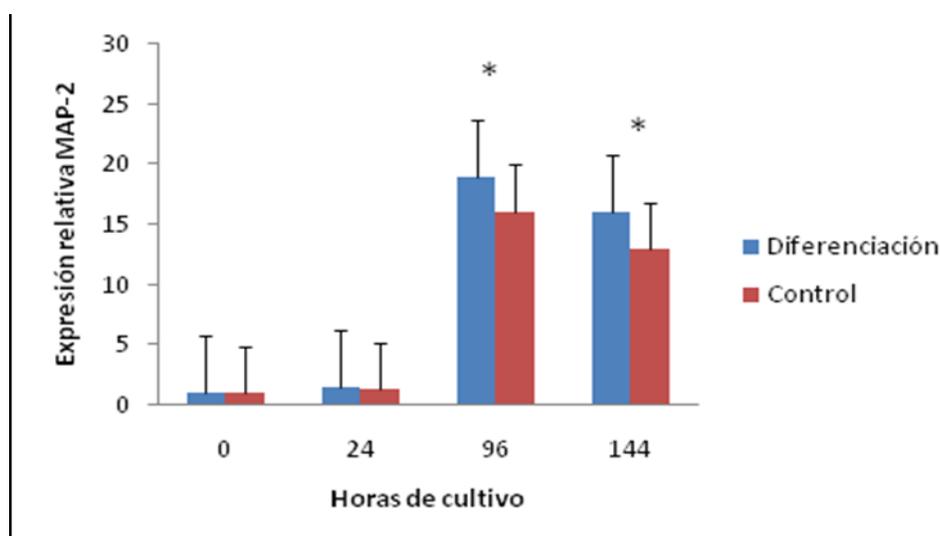
#### **6.2.1.1 Cuantificación de niveles de mRNA de genes neuro-específicos en CMM inducidas hacia diferenciación neurogénica (Protocolo 1)**

La determinación de la expresión relativa de genes neuro-específicos en CMM durante el proceso de diferenciación neurogénica fue realizada por medio de Q-PCR. Se cuantificaron los niveles de mRNA del gen precursor neuronal *NESTIN* y genes implicados en la maduración neuronal *MAP2*, *TrKA* y *NGF* en cultivos de CMM controles y expuestos a medio de diferenciación. Los resultados demostraron un aumento ( $P < 0,05$ ) en los niveles de mRNA de *NESTIN* a las 24 h de cultivo y una posterior disminución a medida que aumentaron las horas de cultivo (96 y 144 h) (Figura 7). Los niveles relativos de expresión fueron 3,7; 2 y 1 veces la expresión de la hora 0 para las 24, 96 y 144 horas de tratamiento respectivamente.

Los niveles de mRNA de *MAP2* aumentaron ( $P < 0,05$ ) a medida que transcurrió la exposición al medio de diferenciación, observándose una expresión relativa de 2,4; 18,9 y 16 veces la expresión de la hora 0, para las 24, 96 y 144 h de cultivo, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre las 24 y 96 h de cultivo en las células expuestas a medio de diferenciación pero no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre el grupo con medio de diferenciación y el control (Figura 8).



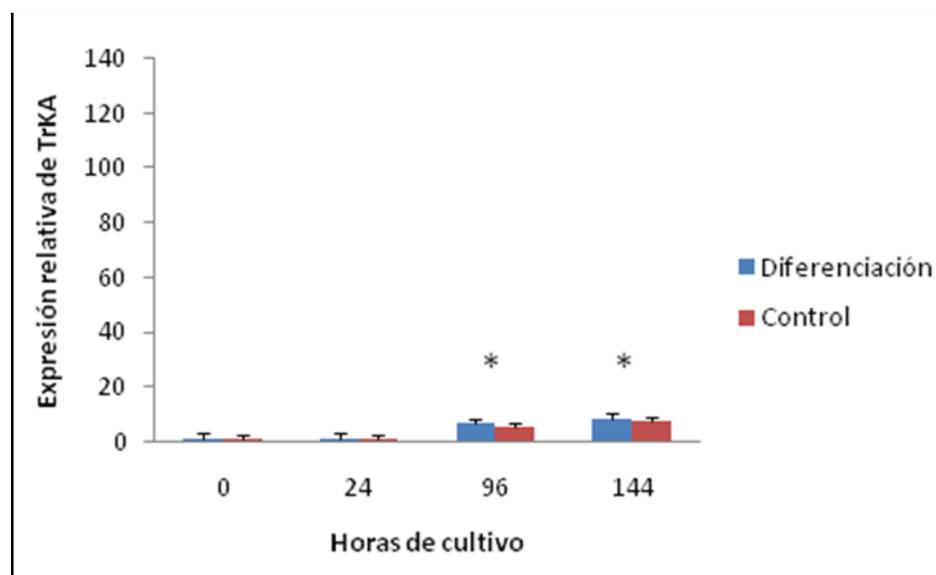
**Figura 7. Expresión relativa de *NESTIN* durante el proceso de diferenciación neurogénica de CMM aisladas desde MO fetal bovina.** La expresión de *NESTIN* disminuye ( $P < 0,05$ ) a medida que aumenta el tiempo diferenciación neurogénica. Superíndices (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre horas de cultivo.



**Figura 8. Expresión relativa de *MAP2* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas.** Existen diferencias significativas en la expresión relativa de *MAP2* entre las 24 y 144h de cultivo en las células expuestas a medio de diferenciación neurogénica. Superíndices (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre horas de cultivo.

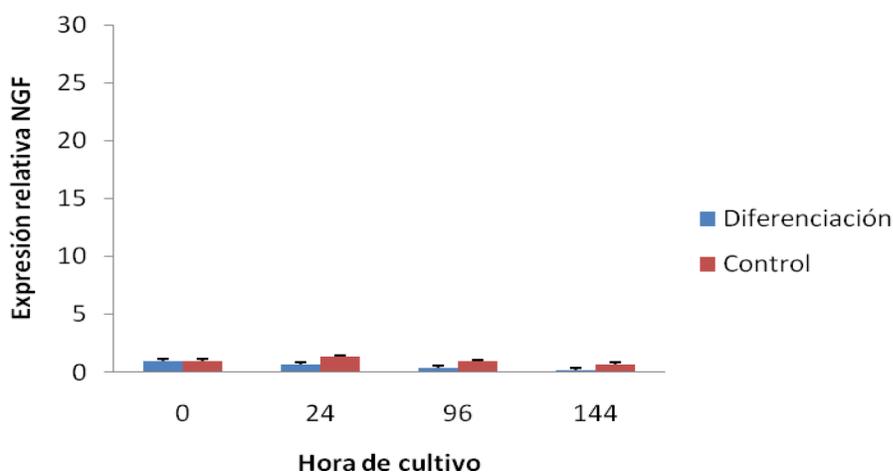
La expresión relativa de *TrKA* presento un incremento ( $P < 0,05$ ) en CMM tratadas con medio de diferenciación de 1,3; 6,6 y 8 veces la expresión de la hora 0, a las 24, 96 y 144 h de tratamiento, respectivamente. Se presentaron diferencias significativas entre 24 h al compararlo con 96 y 144 h de cultivo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre CMM control y tratamiento (Figura 9).

Por su parte *NGF* no mostro una diferencia ( $P > 0,05$ ) en CMM expuestas al medio de diferenciación neurogénica comparado con las células control. Aun así, se detectó una expresión relativa de 0,3; 0,39 y 0,1 veces la expresión de la hora 0 (Figura 10). Este gen no presento diferencias significativas entre las horas de cultivo en el grupo de tratamiento.

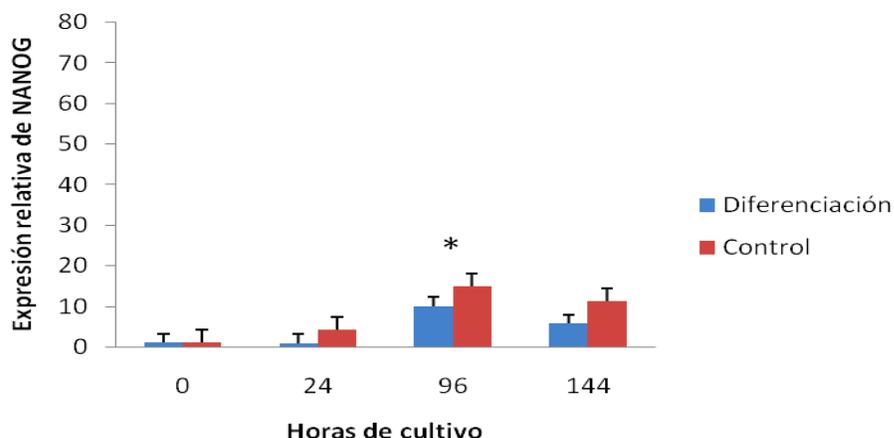


**Figura 9. Expresión relativa de *TrKA* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas.** Existen diferencias significativas en la expresión relativa de *TrKA* entre las 24 en comparación con 96 y 144h de cultivo en CMM control y tratamiento. Sin embargo, no se detectaron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre CMM control y diferenciación. Superíndices (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre horas de cultivo.

El estado de pluripotencia se evaluó por medio de la expresión relativa de *NANOG* sobre las CMM control y expuestas a medio de cultivo con factor de diferenciación neurogénica (Figura 11). En las CMM expuestas a medio de diferenciación neurogénica se detectó un aumento de los niveles de expresión relativa de *NANOG* a las 96 h (10 veces la expresión de 0 h) con una posterior disminución a las 144 h de cultivo (5,8 veces la expresión de 0 h) ( $P < 0,05$ ), en contraste en los controles esta expresión relativa fue de 14,9 y 11,2 a las 96 y 144 h, respectivamente. Según los datos obtenidos los resultados no presentan diferencia significativa entre el grupo control y tratamiento, por lo tanto, no se logra demostrar la pérdida del estado multipotente de las CMM.



**Figura 10. Expresión relativa de *NGF* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM fetales bovinas.** No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de cultivo en las células expuestas a medio de diferenciación comparado con medio control.

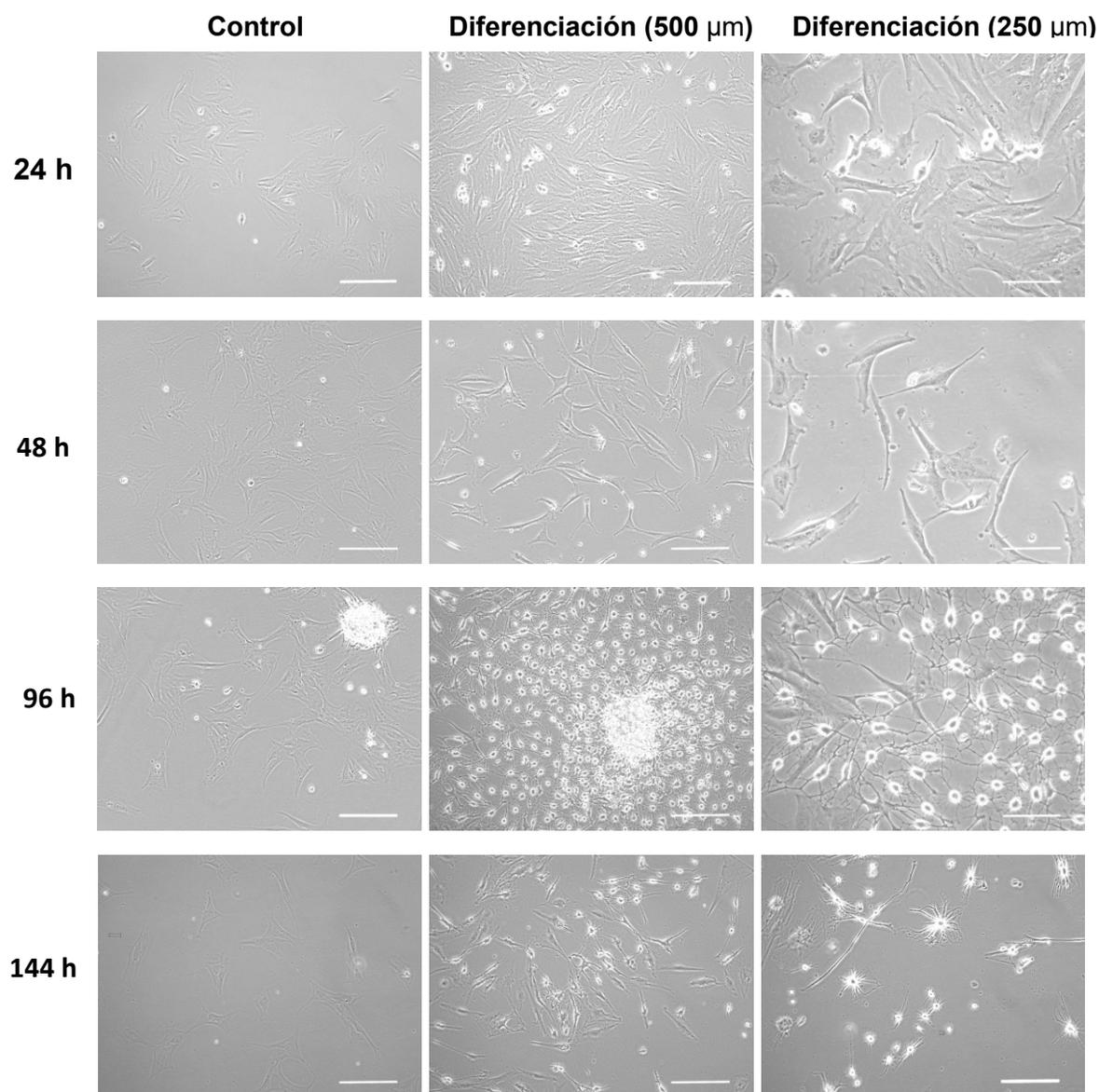


**Figura 11. Expresión relativa de *NANOG* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas.** Se detectó un aumento significativo en el grupo de CMM con medio de diferenciación a las 96 h de cultivo (10 veces la expresión relativa de las 0 h). No se detectaron diferencias significativas entre grupo control y tratamiento. Superíndices distintos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre horas de cultivo.

### 6.2.2 Protocolo 2

El análisis morfológico de las CMM inducidas con el segundo protocolo de diferenciación celular se realizó por medio de observación microscópica. Las CMM expuestas al medio de diferenciación neuronal (protocolo 2) compuesto por una etapa de inducción con bFGF, EGF y 20% SFB seguido de la inducción neuronal con BHA, KCl, ácido valproico, forskolin y suplemento neuronal, expusieron cambios morfológicos significativos, predominando estructuras elongadas con proyecciones celulares. Este protocolo causó una retracción del cuerpo celular y provocó la formación de múltiples y notorias extensiones celulares con formas dendríticas desde las 96 h de cultivo. Con la implementación de este protocolo la mayoría de las células expuestas sufrieron cambios morfológicos importantes, dejando atrás la forma fibroblastoide y

adquiriendo una nueva morfología típica de células neuronales en desarrollo (Figura 12)



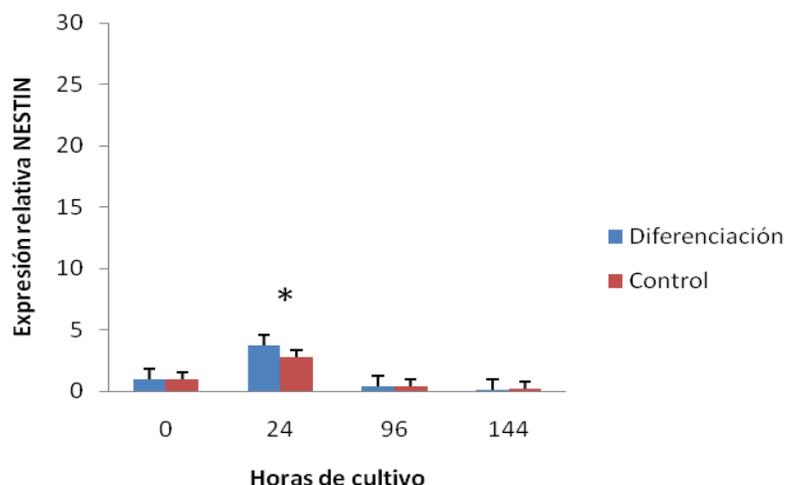
**Figura 12. Microfotografía de cultivo de CMM fetales bovinas aisladas por medio de adherencia al plástico y expuestas a medio de diferenciación neurogénica (Protocolo 2).** Las CMM expuestas a medio de diferenciación mostraron retracción de los cuerpos celulares y formación de múltiples y complejas proyecciones desde las 24 h de cultivo. Escala de barra: 500  $\mu\text{m}$  (Control, diferenciación 500  $\mu\text{m}$ ), 250  $\mu\text{m}$  (Diferenciación 250  $\mu\text{m}$ ).

### 6.2.2.1 Cuantificación de niveles de mRNA de genes neuro-específicos en CMM inducidas hacia diferenciación neurogénica (Protocolo 2)

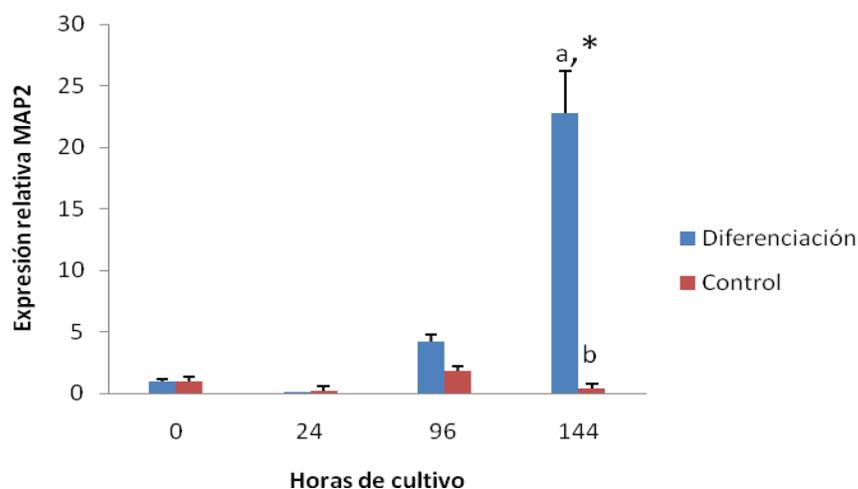
La cuantificación de la expresión relativa de genes neuro-específicos presentes durante la fase de diferenciación neuronal en el segundo protocolo de diferenciación se realizó por medio de Q-PCR para los genes *NESTIN*, *TRKA*, *MAP2*, *NGF*, *PrPC* y *NANOG* y por medio de inmunofluorescencia para los genes *NESTIN*, *MAP2*, *TRKA* y *PrPC*.

La expresión relativa de *NESTIN* fue cuantificada en las células expuestas a medio de diferenciación neurogénica junto con grupos control que no fueron expuestos a medio de diferenciación. Dentro de este resultado se pudo detectar que durante el periodo de cultivo celular, la expresión de *NESTIN* fue disminuyendo ( $P < 0.05$ ) paulatinamente a medida que transcurrió el tiempo de cultivo (0, 24, 96 y 144 h). Para este gen los niveles de expresión relativa encontrados fueron de 3,74; 0,3 y 0,1 (24, 96 y 144 h de tratamiento respectivamente) veces la expresión de la hora 0, encontrándose una diferencia significativa entre las 24 y 96, 144 horas de cultivo (Figura 13).

Por su parte *MAP2* presento un incremento ( $P < 0,05$ ) es su expresión relativa a medida que aumento el tiempo de exposición al medio de diferenciación, registrándose una expresión relativa de 0,1; 4,1 y 22,8 veces la expresión de este gen a la hora 0 (24, 96 y 144 h de cultivo, respectivamente). Se encontraron diferencias significativas entre las 24 y 144h de cultivo en las células expuestas a medio de diferenciación, además se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre el grupo con medio de diferenciación y el control a las 144 h (Figura 14).

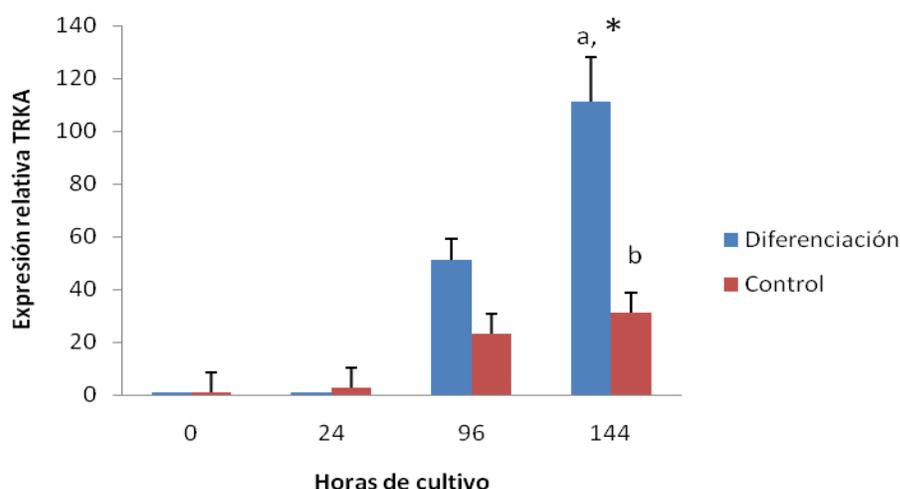


**Figura 13. Expresión relativa de *NESTIN* durante el proceso de diferenciación neurogénica de CMM bovinas (Protocolo 2).** A medida que aumenta el tiempo diferenciación neurogénica en las CMM se observó una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre la muestra de 24 h de cultivo y las muestras de 96 y 144 h de cultivo. Superíndices (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre horas de cultivo.



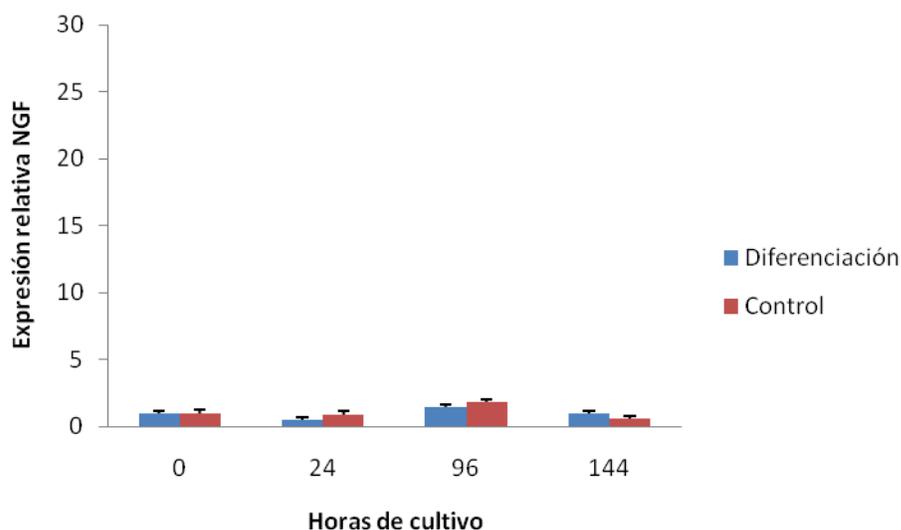
**Figura 14. Expresión relativa de *MAP2* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).** Existen diferencias significativas entre las 24, 96 y 144h de cultivo en las células expuestas a medio de diferenciación neurogénica. Superíndices distintos (a, b, \*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre horas de cultivo.

La expresión relativa de *TrKA* en CMM que fueron expuestas a medio de diferenciación presentó un aumento ( $P < 0,05$ ) de 0,7; 51,3 y 111,1 veces la expresión de la hora 0 a las 24, 96 y 144 h de tratamiento, respectivamente. Se determinó diferencias significativas entre 24 h con 96 h y 144 h de cultivo, además de presentar diferencia significativa entre grupos control y tratamiento a las 144 horas de cultivo (Figura 15).



**Figura 15. Expresión relativa de *TrKA* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).** Existe un notable aumento ( $P < 0,05$ ) entre las 24 h y 144 h de cultivo en las CMM expuestas a medio de diferenciación neurogénica. Superíndices distintos (a, b, \*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

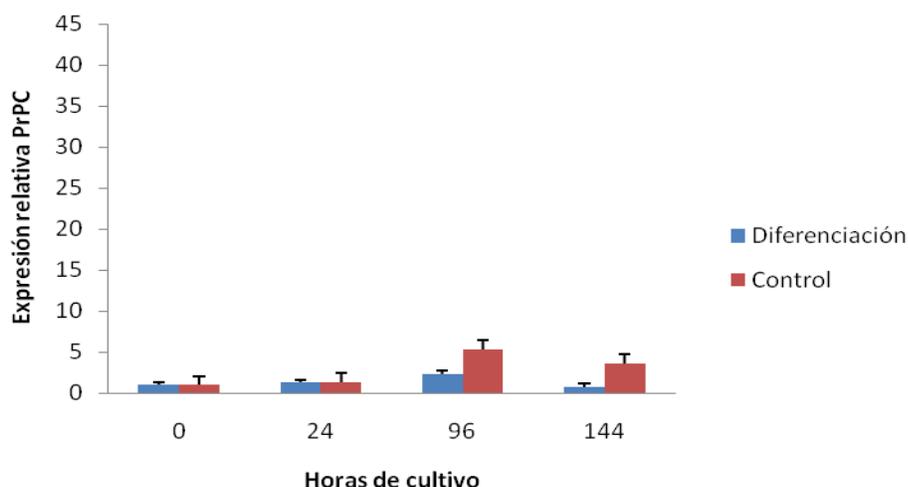
Los niveles de mRNA de *NGF* no fueron distintos ( $P > 0,05$ ) en las CMM células expuestas al medio de diferenciación neurogénica comparado con las células control. Aun así, se detectaron niveles de 0,4; 1,4 y 0,9 veces la expresión a la hora 24, 96 y 144 h de tratamiento, respectivamente (Figura 16). Los niveles de mRNA de *NGF* no fueron significativamente distintos entre horas de cultivo en el grupo de tratamiento ni entre grupos.



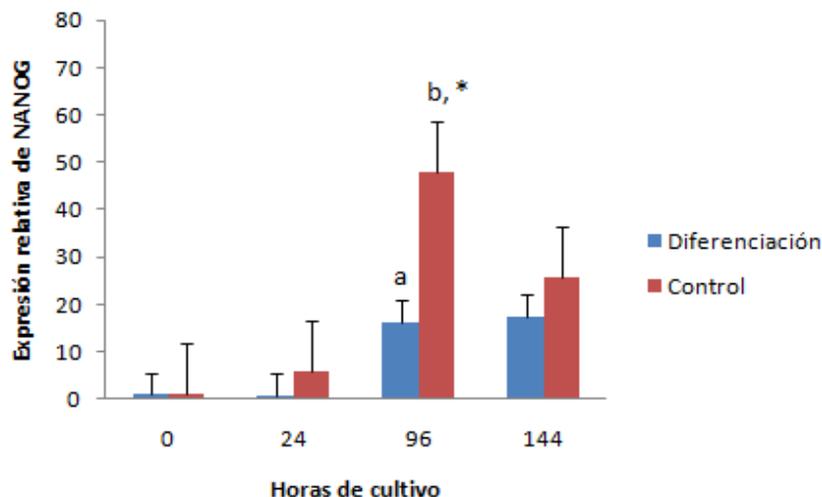
**Figura 16. Expresión relativa de *NGF* durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).** No existen diferencias significativas entre los grupos de cultivo en las células expuestas a medio de diferenciación.

Por otra parte, la expresión relativa de PrP<sup>C</sup> (Figura 17) en las células que fueron expuestas a medio de diferenciación neurogénica no fue distinta ( $P > 0,05$ ), tanto entre tratamiento y control como entre tiempos de toma de muestra.

Los niveles relativos de mRNA de NANOG en las CMM expuestas a medio de diferenciación ( $P < 0,05$ ) eran menores a las 24, 96 y 144 h en comparación con el grupo control, siendo 0,8; 16,3 y 17,4 veces la expresión de la hora 0 en el grupo tratamiento, encontrando diferencia significativa entre a las 96 horas en comparación a la hora 0. El grupo control tuvo una expresión relativa de 5,8; 47,8 y 25,7 veces la expresión de la hora 0 (24, 96 y 144 h de cultivo, respectivamente) (Figura 18).



**Figura 17. Expresión relativa de PrPC durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).** No existen diferencias significativas entre los grupos de cultivo ni en las diferentes horas de diferenciación en las células expuestas a medio de diferenciación.



**Figura 18. Expresión relativa de NANOG durante el proceso de diferenciación neurogénica en CMM bovinas (Protocolo 2).** Existen mayores niveles de expresión relativa en los grupos control que diferenciación. En las CMM expuestas a medio de diferenciación hubo diferencia significativa entre 0 h y 96 h de cultivo con 1 y 16.3 veces expresión relativa, respectivamente. Superíndices distintos (a, b, \*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

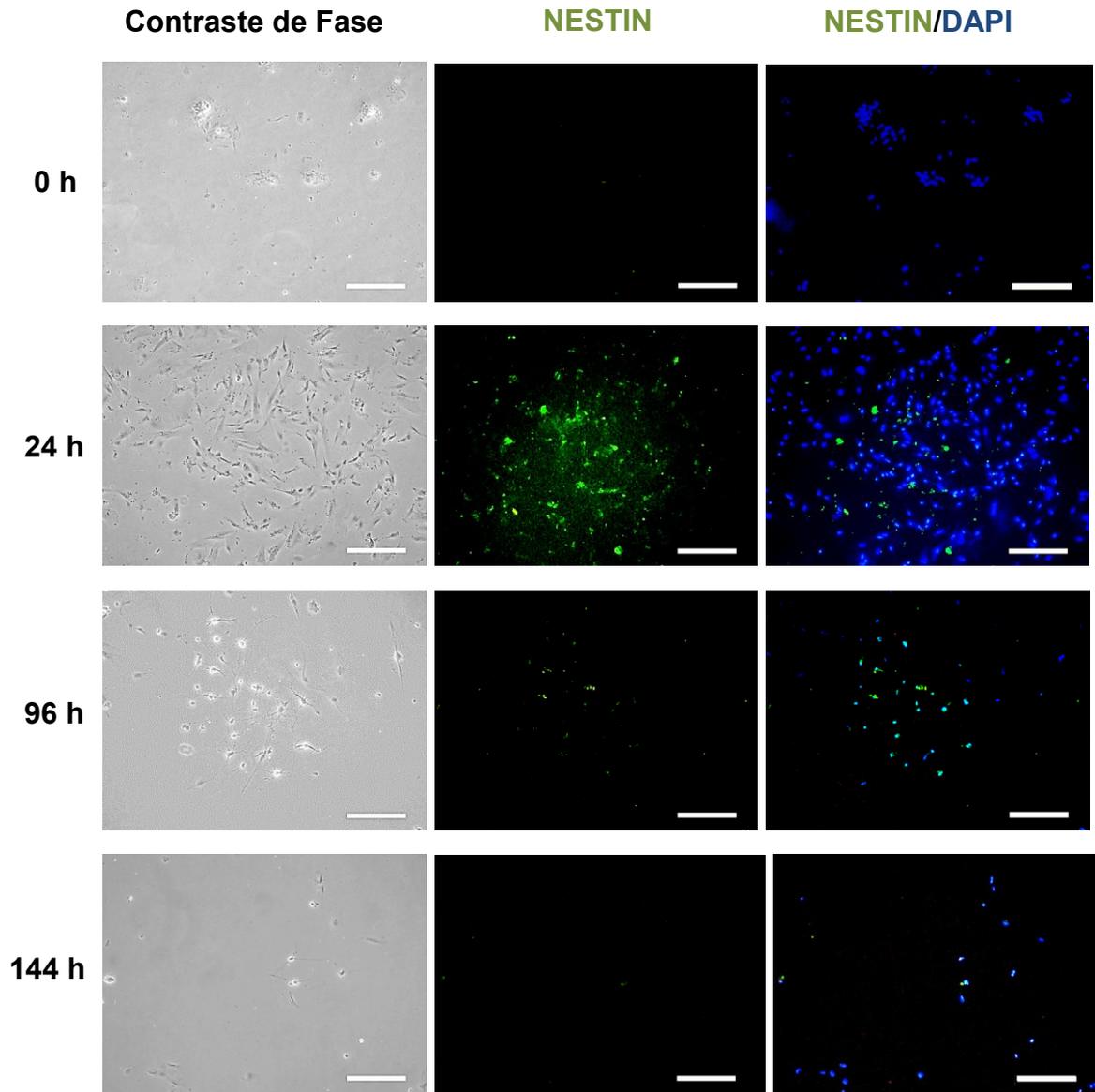
### 6.2.2.2 Inmunodetección de marcadores neuro-específicos en CMM inducidas hacia diferenciación neurogénica

Se realizó análisis de inmunofluorescencia para la detección de las proteínas de NESTIN, MAP2, TRKA y PrP<sup>C</sup> en CMM sometidas al proceso de diferenciación neurogénica (Protocolo 2). Por medio de esta técnica se logró inmunodetectar a NESTIN entre las 0 y 24 horas de cultivo (Fig. 19). A medida que el tiempo de cultivo avanza la intensidad de fluorescencia de NESTIN decrece, esto debido a que NESTIN es un marcador temprano de diferenciación neurogénica presente en los filamentos intermedios celulares y es así que a las 96 y 144 horas de cultivo no se detectó presencia de este marcador.

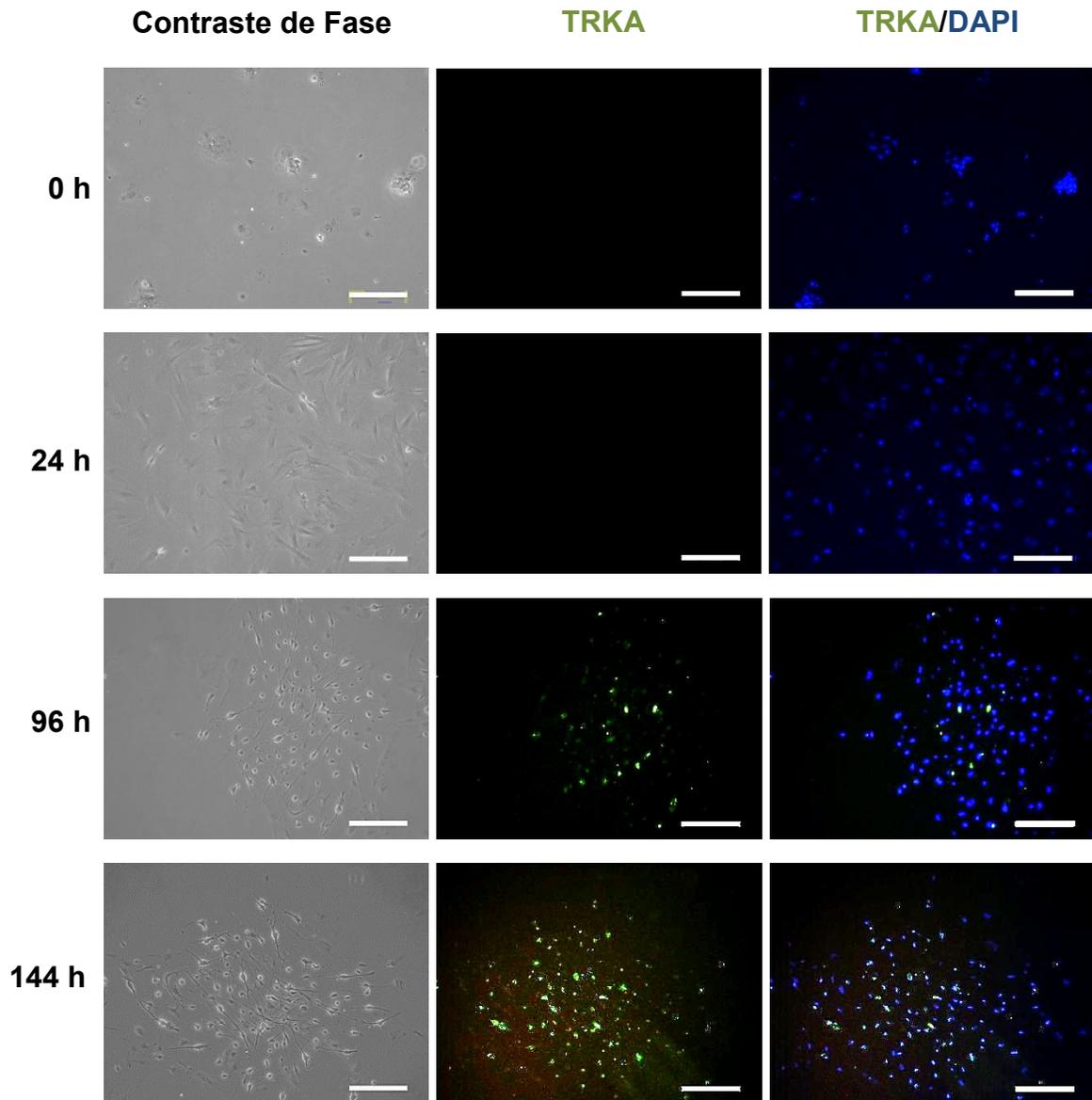
En forma similar, el aumento en los niveles de mRNA de *TRKA* pudo ser confirmada mediante la inmunodetección de la proteína de TRKA, detectándose una intensidad de fluorescencia creciente a partir de las 96 horas de cultivo y alcanzando mayor intensidad a las 144 horas de diferenciación neuronal. En las primeras 24 horas de cultivo no se detectó fluorescencia para TRKA en las células en proceso de diferenciación neuronal (Fig. 20).

Por otra parte al realizar el ensayo de inmunodetección de MAP2 se logró establecer una mayor intensidad de fluorescencia asociada a MAP2 desde las 96 horas de cultivo. Cabe resaltar que esta fluorescencia esta presente desde las 0 horas, pero a medida que aumenta el tiempo de cultivo la intensidad de la fluorescencia aumenta de manera notable (Figura 21).

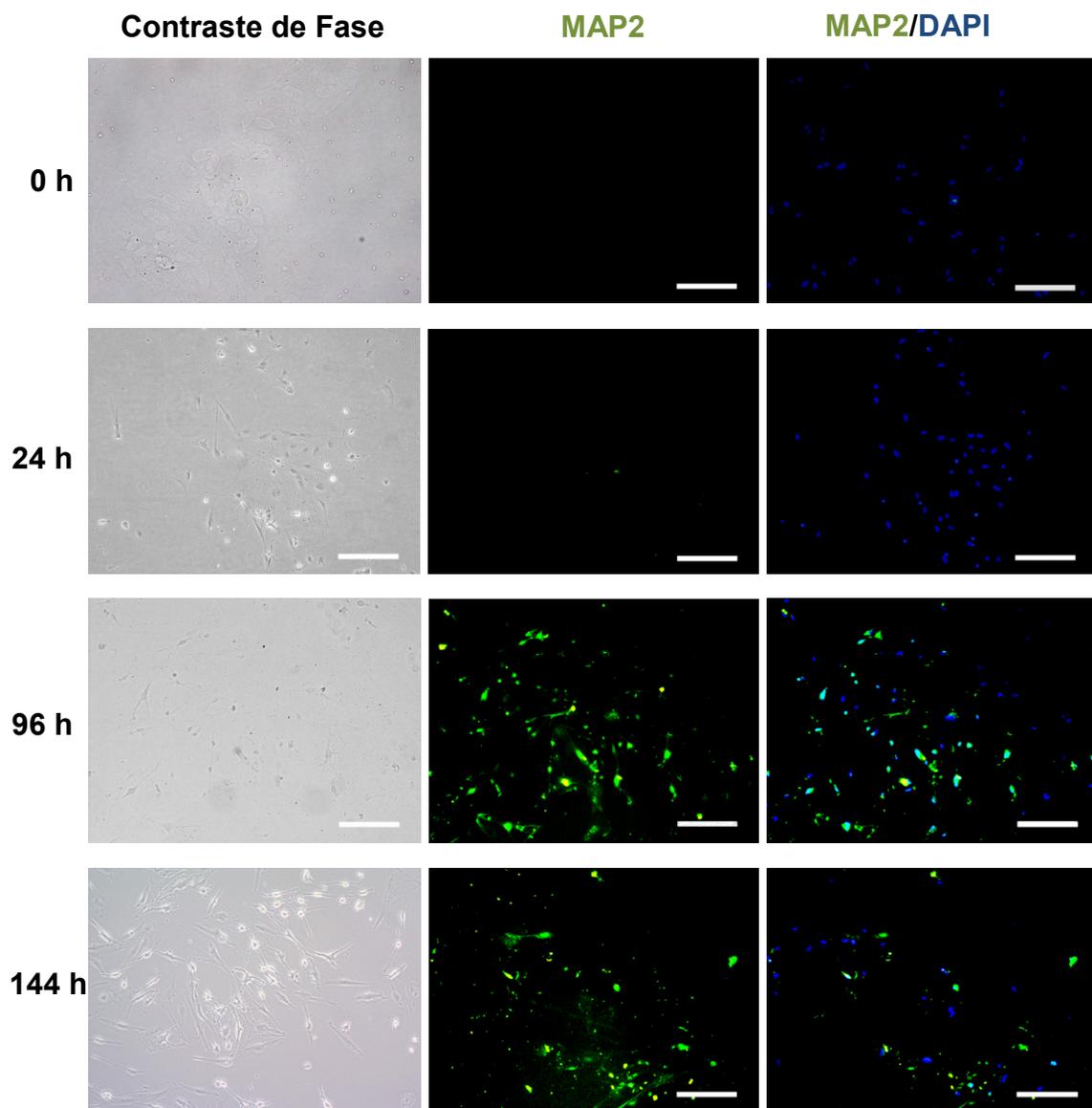
La expresión de PrP<sup>C</sup> fue inmunodetectada a las 144 horas de cultivo en células con medio de diferenciación neurogénico. En los cultivos de 0, 24 y 96 horas de cultivo con medio de diferenciación neuronal se aprecia una muy baja intensidad de fluorescencia (Figura 22)



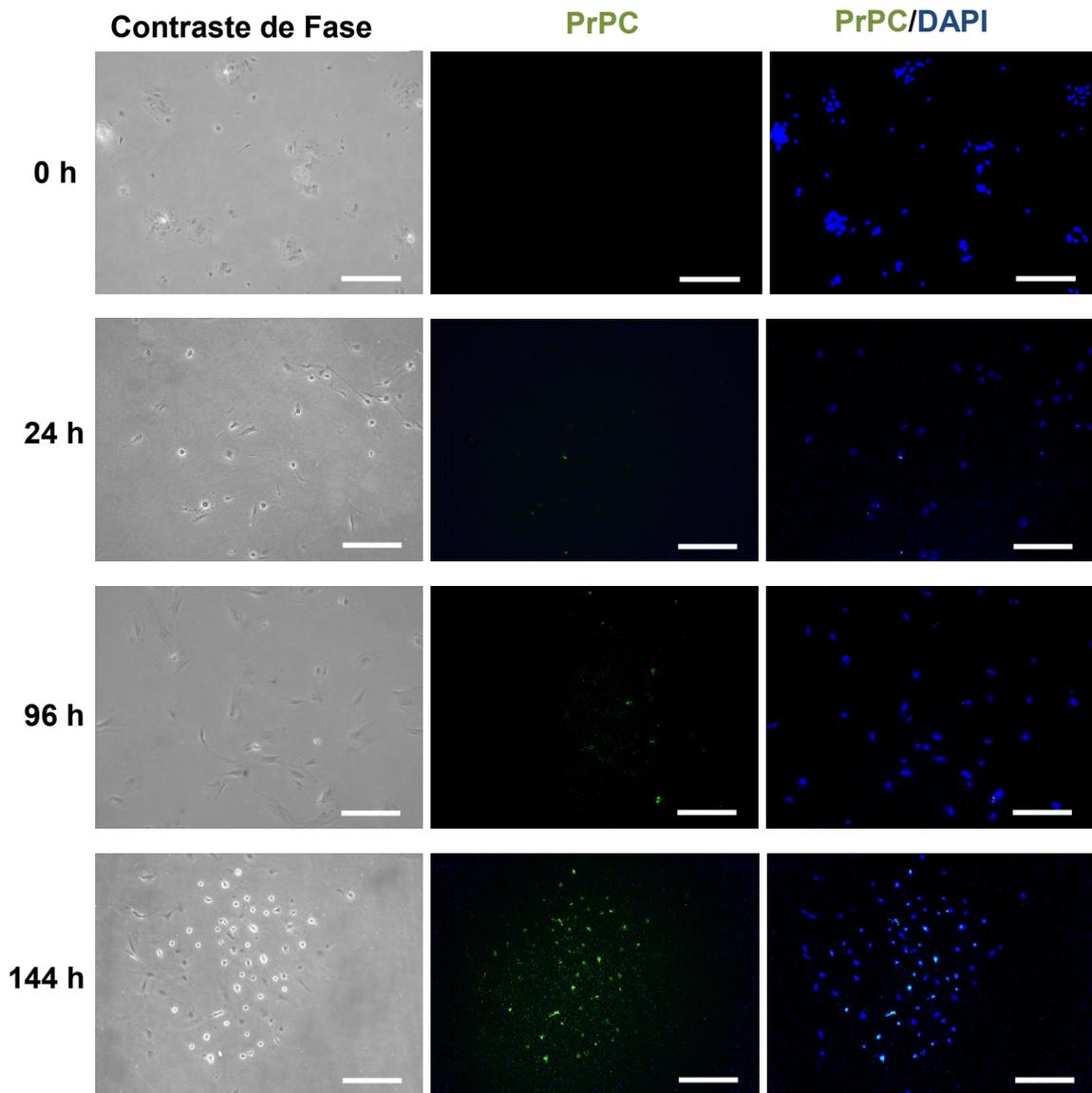
**Figura 19. Inmunodetección de NESTIN en CMM fetales bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas. Se observó mayor intensidad de fluorescencia específica en las primeras horas de cultivo (C, F) con una disminución progresiva a medida que aumenta las horas de cultivo (I, L). Barra de escala= 200  $\mu$ m.**



**Figura 20. Inmunofluorescencia asociada a TRKA en CMM bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas. Se observó mayor intensidad de fluorescencia específica desde las 96 h de cultivo (F) aumentado a medida que transcurre el cultivo (I,L). Barra de escala= 200  $\mu$ m.**



**Figura 21. Inmunofluorescencia asociada a MAP2 en CMM bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas. Se observó mayor intensidad de fluorescencia desde las 96 h de cultivo (F) incrementando con el paso de las horas de cultivo (I,L). Barra de escala= 200  $\mu$ m.**



**Figura 22.** Inmunofluorescencia asociada a PrPC en CMM bovinas expuestas a medio de diferenciación neurogénica durante 144 horas. Se detecta mayor intensidad de fluorescencia a las 144 horas de cultivo (L). Barra de escala= 200  $\mu$ m.

## 7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se realizó el aislamiento de CMM desde MO extraídas desde fetos bovinos derivados de matadero, en base a su capacidad de adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar. Diversos estudios han demostrado la eficiencia de selección de CMM que posee este método, en varios modelos animales incluyendo el bovino (Bosnakovski et al., 2004), murino (Soleimani y Nadri, 2009), equino (Radcliffe et al., 2010) y canino (Kadiyala et al., 1997). La técnica de adherencia al plástico ha demostrado ser un método de selección confiable, eficaz y de fácil aplicación para el aislamiento de CMM desde MO fetal bovina. Sin embargo, se observó que los cultivos de CMM aisladas por este método van acompañados de una población celular heterogénea que incluye otros tipos celulares adherentes al plástico como fibroblastos, adipocitos, etc. Además, este tipo de cultivo es heterogéneo en cuanto a su grado de indiferenciación ya que existen células progenitoras en diferente grado de cometido (Russell et al., 2010). En estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha reportado que las poblaciones de CMM aisladas desde MO fetal bovina poseen varias características además de su capacidad de adherencia al plástico y de crecimiento en monocapa, como la presencia de morfología fibroblastoide y la habilidad de diferenciación a tejidos de origen mesodérmico que incluyen osteogénico, condrogénico, adipogénico y recientemente tejido de origen endodérmico como hepatogénico (Cortes et al., 2013; Dueñas et al., 2014).

Los análisis de citometría de flujo detectaron que los cultivos primarios de células aisladas desde MO bovina poseen una población mayoritariamente positiva a marcadores específicos de superficie de CMM como CD29 (76,3 %) y CD73 (96,8 %). Además, estas poblaciones celulares presentaron un alto porcentaje de negatividad a marcadores específicos de superficie de la línea hematopoyética como CD34 y CD45 (93,4 % y 95,6 %, respectivamente). La

citometría de flujo ha sido utilizada para analizar CMM de MO humana detectando negatividad para marcadores hematopoiéticos como CD34 y CD45 y positividad para marcadores específicos de CMM como CD73 y CD105 (Kozanoglu et al., 2009).

Por medio de Q-PCR este estudio demostró que la población celular adherente al plástico presentó un alto nivel de mRNA de marcadores específicos de CMM como CD73, CD90 y CD105. Además, en esta misma población celular los marcadores hematopoiéticos CD34 y CD45 presentaron bajo niveles de mRNA siendo similar a estudios realizados anteriormente en CMM de MO derivada de fetos bovinos (Cortes et al., 2013). Considerando las normas establecidas por ISCT y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en citometría de flujo y Q-PCR para los macadores mesenquimales y hematopoyéticos, estos resultados permiten concluir que la población celular extraída de MO de fetos bovinos corresponde a CMM.

El análisis de expresión de marcadores como OCT4 y NANOG detectó que la población celular utilizada para la realización de los ensayos expresaba marcadores de pluripotencia NANOG y OCT4. Estos factores de transcripción están implicados en el proceso mantenimiento del estado de pluripotencia en embriones y en células madre embrionarias (Loh et al., 2006). Además, estos factores están presentes en células madre adultas, sin embargo, su utilización cómo marcadores de pluripotencia ha sido cuestionada (Riekstina et al., 2009).

Mediante estudios de proliferación celular, se detectó un crecimiento continuo de las CMM hasta el pasaje 7. Posteriormente esta tasa decrece a medida que aumentan los pasajes, siendo estos datos congruentes con estudios realizados en CMM aisladas de MO de ternero donde se detectó una tasa de crecimiento hasta el pasaje 10 con una posterior reducción en el doblaje celular (Colleoni et al., 2005). En forma similar, en estudios realizados en humanos se reportó que la senescencia de las CMM comienza en el pasaje 3 (Dmitrieva et al., 2012),

sugiriendo que existe una diferencia proliferativa de las CMM con respecto a la edad del individuo del cual son extraídas. Es así, que mediante el ensayo de proliferación realizado a la población celular en estudio se corroboró lo reportado en estudios anteriores (Colleoni et al., 2005; Dmitrieva et al., 2012).

Las CMM han sido una fuente atractiva para el estudio y desarrollo de potenciales tratamientos terapéuticos y regeneración de tejidos en modelos animales y humano. Por esto se crea la necesidad de aumentar los conocimientos sobre su biología bajo condiciones *in vitro*. Las características específicas de las CMM incluyendo su potencial proliferativo y la habilidad de diferenciación en varios tipos celulares como osteocito, condrocito y adipocito las convierte en una herramienta atractiva para la medicina regenerativa (Bobis et al., 2006). Debido a las dificultades de obtención de células madre neurales desde adultos y de los problemas éticos para su aislamiento desde tejido fetal, la identificación de alternativas celulares para terapias en sistema nervioso central cobra gran relevancia (Delcroix et al., 2010). En el caso de animales domésticos, la diferenciación *in vitro* de las CMM en células neuronales puede llegar a convertirse en un modelo eficaz para el estudio *in vitro* de enfermedades concernientes al sistema nervioso central. En el caso del bovino, este modelo de diferenciación celular puede servir para el estudio de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, cuyo agente causal es la isoforma mal plegada de la proteína PrPC (Peralta et al., 2011).

Mediante la exposición a factores de diferenciación presentes en el medio de cultivo *in vitro*, se intentó inducir la diferenciación de las CMM hacia linaje neurogénico mediante la utilización de dos protocolos previamente descritos. El primer protocolo fue basado en la suplementación de BME al medio de cultivo como fue reportado en CMM diferenciadas a linaje neuronal en modelos murino y humano (Woodbury et al., 2000). El BME es conocido como un potente antioxidante, que interviene e incrementa la secreción de acetil colina transferasa

en células con proceso de diferenciación neuronal (Ni et al., 2001). Además, este agente produce una rápida formación neuronal, caracterizándose por la aparición de neurofilamentos y generación de neuritogenesis (Woodbury et al., 2000). Durante el período de pre-inducción por 24 horas se observó que el BME no produce cambios sobre la morfología celular, sin embargo, posteriormente la morfología fibroblastoide se pierde progresivamente dando lugar a una retracción del cuerpo celular con aparición de elongaciones y expresión de marcadores neuronales como NESTIN, MAP2, NGF y TRKA. En consecuencia, los cambios morfológicos logrados con la suplementación de BME indicarían la existencia de un posible proceso de diferenciación celular, similar a lo descrito en especies murina y humana (Woodbury et al., 2000). Sin embargo, a medida que aumento el tiempo de exposición a BME, se detectó una disminución de los niveles de mRNA de marcadores de maduración neuronal, al igual que una baja en la supervivencia celular dentro de los cultivos expuestos a BME, disminuyendo progresivamente las CMM adheridas al plástico medida que avanzaba el cultivo, sugiriendo así que este protocolo de inducción neuronal con BME no es viable para la inducción neuronal. Estudios anteriores reportaron que protocolos basados en BME pueden inducir fenotipo neuronal en otros tipos celulares que carecen de características de células madre (fibroblastos, HEK293 y células PC-12) (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Por lo tanto, la posible apariencia neuronal presente en subpoblaciones de CMM expuestas a este agente pudo estar asociada a la disrupción del citoesqueleto producto de estrés químico y no como consecuencia de un proceso de diferenciación neuronal.

En un segundo protocolo de diferenciación neuronal, se utilizó una etapa de pre inducción con factores de crecimiento y posteriormente una etapa de inducción con factores previamente reportados (Delcroix et al., 2010; Tatard et al., 2007). En la etapa de pre inducción se utilizó EGF y bFGF como factores asociados a la activación del ciclo celular y potencialmente a la activación de la expresión de

genes neuronales (Delcroix et al., 2010). Posteriormente, el medio de inducción estuvo compuesto de KCl, ácido valproico, BHA y forskolin, componentes que han sido reportados como inductores de cambios inmunocitoquímicos y morfológicos en CMM humanas y murinos (Safford et al., 2002). En nuestro estudio, la exposición de CMM a este protocolo indujo cambios morfológicos que incluyeron la retracción del cuerpo celular con formación de extensiones celulares, resultados congruentes con cambios inmunocitoquímicos obtenidos en el transcurso del estudio. La expresión inicial de proteínas progenitoras neuronales como NESTIN demuestran un estado de diferenciación hacia el linaje neurogénico (Woodbury et al., 2000). NESTIN es una proteína presente en filamentos intermedios del citoesqueleto durante la división de células (Park et al., 2010). En este estudio se detectó la presencia de esta proteína a las 24 h de cultivo, posteriormente presentándose una disminución de su expresión hasta obtener su mínima expresión a las 144 h de cultivo. La presencia de NESTIN al inicio del ensayo posiblemente fue consecuencia de su participación en la fosforilación de vimentina, la cual impide la reorganización de los microtubulos durante el estado inicial de desarrollo neural (Michalczyk and Ziman, 2005), sugiriendo cierta similitud con resultados obtenidos en diferenciación de CMM humanas (Tatard et al., 2007). Al mismo tiempo que la expresión de NESTIN era mayor (3,74 veces la expresión de 0 h), MAP2 que es una proteína presente en los microtúbulos celulares y está asociada a la maduración neuronal, iniciaba un aumento en su expresión relativa a las 24 h a 144 h (0,1 a 22,8 veces la expresión a las 0 h, respectivamente) al igual que TRKA, el cual alcanzó su máxima expresión a las 144 h (111,1 veces la expresión a las 0 h). En este estudio la inmunodetección de las proteínas MAP2 y TRKA indicaron una sobre regulación de estas en las células expuestas a medio de diferenciación, con lo cual se corrobora los resultados obtenidos con Q-PCR donde arrojó aumento en la expresión relativa de los genes MAP2 y TRKA involucrados en el proceso de maduración neuronal, sugiriendo así que

las CMM expuestas a medios de diferenciación neuronal fueron inducidas hacia el linaje neural. El aumento en la expresión de MAP2 ha sido descrita anteriormente en CMM humanas expuestas a factores de diferenciación neuronal (Tondreau et al., 2004). Del mismo modo la presencia de mRNA de TRKA sugiere un estado de maduración neuronal (Woodbury et al., 2000). TRKA está presente en membrana celular, participa en la internalización de su ligando NGF, este efecto en la internalización de señalización del receptor es especialmente relevante en la consideración de las respuestas biológicas a las neurotrofinas (Zhang et al., 2000). Estudios indican que la internalización y el transporte del complejo ligando-receptor es requerido para iniciar respuestas del cuerpo a proteínas derivadas de neurotrofina, proceso importante para la diferenciación neuronal (Zhang et al., 2000). Los niveles mRNA de TrkA presentes en el cultivo expuesto a BME demostraron presencia de este receptor en las etapas finales de diferenciación. Estos datos indican la adquisición de un fenotipo neuronal en las CMM durante el proceso de diferenciación *in vitro* como ha sido descrito previamente en los modelos murino y humano (Woodbury et al., 2000). Por su parte, la expresión relativa de los niveles de NGF no alcanzo los valores esperados, ya que se esperaba un nivel de expresión mayor en las células que fueron expuestas a medio de diferenciación neurogénico. Esto debido a su contante interacción con su receptor TRKA y su influencia en la diferenciación y supervivencia neuronal (Zhang et al., 2000). Dentro de los resultados obtenidos en los dos protocolos de diferenciación neurogénica se puede destacar que si bien en ambos la expresión de NESTIN a las 24 h de cultivo fue alta, solo en el segundo protocolo de diferenciación se evidencio un verdadero proceso de diferenciación neuronal confirmada por la sobre expresión de marcadores de maduración neuronal a las 144 h de cultivo como MAP2 y TRKA, en contraposición a la disminución en la expresión de NANOG como marcador de multipotencia en las CMM expuestas a medio de diferenciación.

El estado de multipotencia celular fue evaluado por medio de la cuantificación de la expresión del gen de pluripotencia NANOG en CMM bovinas fetales durante el proceso de diferenciación. Los análisis realizados en este estudio detectaron una disminución en los niveles de mRNA de NANOG en las CMM que fueron expuestas a medio de cultivo suplementado con BME. Estos resultados sugieren que la suplementación de BME produce la pérdida progresiva del estado multipotente en CMM. Estudios previos demostraron que la presencia del gen NANOG juega un rol importante en células madre embrionarias, manteniendo su autorenovación e inhibiendo su diferenciación e indicando un estado de pluripotencia celular (Nichols et al., 1998). En CMM se ha reportado que NANOG está involucrado en la sobre regulación de Dnmt1 (metiltransferasa 1) que a la vez está reprimiendo la expresión p16 y p21, genes asociados con el desarrollo y la diferenciación de linaje (Tsai et al., 2012). Esto sugiere que al haber sido expuestas las CMM a medios de diferenciación neurogénica estas células presentaron una disminución de los niveles de expresión de NANOG y por lo tanto sufrieron una posible pérdida del estado multipotente típico de una CMM en estado de indiferenciación.

## 8 CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos en este estudio se demostró que la exposición de CMM a un factor de diferenciación como BME, induce cambios en su morfología. Sin embargo, los resultados de análisis de QPCR e inmunocitoquímicos indican que dichos cambios morfológicos son posiblemente debidos a efectos citotóxicos de BME más que a inducción neurogénica. Por otra parte, en el segundo protocolo de diferenciación celular, la disminución de la expresión relativa de NANOG sugiere la pérdida del estado de multipotencia de las CMM sometidas a medio de diferenciación neurogénica. Conjuntamente, la disminución del marcador neuronal progenitor (NESTIN) y el aumento de la expresión de marcadores involucrados con la maduración neuronal (MAP2 y TRKA indican que las CMM fueron inducidas hacia un proceso de diferenciación neuronal. Por último, la facilidad en el aislamiento de CMM de MO de fetos bovinos y su potencial de diferenciación hacia linajes celulares de origen mesodérmico y en este caso ectodérmico las convierte en una alternativa promisorio para la investigación de la biología y aplicación de las CMM en terapias regenerativas en medicina veterinaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Airas, L., Sirpa, J., 1996. CD73 Mediates Adhesion of B Cells to Follicular Dendritic Cells. *J. Cells Biol.* 88, 1755– 1764.
- Altin, J.G., Sloan, E.K., 1997. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* 75, 430–45.
- Battula, V.L., Bareiss, P.M., Treml, S., Conrad, S., Albert, I., Hojak, S., Abele, H., Schewe, B., Just, L., Skutella, T., Bühring, H.-J., 2007. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation.* 75, 279–91.
- Bithell, A., Finch, s., Hornby, m., Williams, B., 2008. Fibroblast growth factor 2 maintains the neurogenic capacity of embryonic neural progenitor cells in vitro but changes their neuronal subtype specification. *Stem Cells* 26, 1565– 1574.
- Bobis, S., Jarocho, D., Majka, M., 2006. Mesenchymal stem cells : characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 44, 215–230.
- 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, 243–53.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., Fujinaga, T., 2006. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 1152– 63.
- Bossolasco, P., Corti, S., Strazzer, S., Borsotti, C., Delbo, R., Fortunato, F., Salini, S., Quirici, N., Bertolini, F., Gobbi, A., Deliliers, G., Pietro Comi, G., 2004. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp. Cell Res.* 295, 66– 78.

- Calloni, R., Viegas, G.S., Türck, P., Bonatto, D., Pegas Henriques, J.A., 2014. Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. *Cytotherapy* 16, 3–16.
- Chun, L.L.Y., Patterson, P.H., 1977. Of nerve growth factor in the development rat sympathetic neurons *Assays. J. Cell Biol.* 75, 694–704.
- Chung, T.-H., Chang, J.-Y., Lee, W.-C., 2009. Application of magnetic poly(styrene–glycidyl methacrylate) microspheres for immunomagnetic separation of bone marrow cells. *J. Magn. Magn. Mater.* 321, 1635–1638.
- Colleoni, S., Donofrio, G., Lagutine, I., Duchi, R., Galli, C., Lazzari, G., 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7, 154– 163.
- 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 bovine fetuses. *BMC Vet. Res.* 9, 133– 147.
- Delcroix, G.J.-R., Curtis, K.M., Schiller, P.C., Montero-Menei, C.N., 2010. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation.* 80, 213–227.
- Diaz, P., Cuevas, F., Peralta, O., 2015. GFP labelling and epigenetic enzyme expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from bovine foetuses. *Res. Vet. Sci.* 99, 120– 128.
- Dmitrieva, D., Minullina, I., Bilibina, A., Tarasova, O., Anisimov, S., 2012. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, differences and similarities. *Cell Cycle* 11, 377– 383.
- Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., Schieker, M., 2007. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 21–38.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, a, Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

- Donofrio, G., Colleoni, S., Galli, C., Lazzari, G., Cavirani, S., Flammini, C.F., 2005. Susceptibility of bovine mesenchymal stem cells to bovine herpesvirus 4. *J. Virol. Methods* 127, 168–170.
- Dueñas, F., Becerra, V., Cortes, Y., Vidal, S., Sáenz, L., Palomino, J., De Los Reyes, M., Peralta, O. a, 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet. Res.* 10, 154.
- Erickson, I.E., van Veen, S.C., Sengupta, S., Kestle, S.R., Mauck, R.L., 2011. Cartilage matrix formation by bovine mesenchymal stem cells in three-dimensional culture is age-dependent. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469, 2744–2753.
- Fonsatti, E., MAIO, M., 2004. Highlights on endoglin (cd105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J. Transpl. Med.* 2, 18– 24.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I., Petrakova, K., 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morph.* 16, 381– 390.
- Furness, S., Mcnacny, K., 2006. Beyond mere markers. Functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Inmunol. Res.* 34, 13–32.
- Geetha, T., Rege, S.D., Mathews, S.E., Meakin, S.O., White, M.F., Babu, J.R., 2013. Nerve growth factor receptor TrkA, a new receptor in insulin signaling pathway in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 288, 23807–23813.
- Haeryfar, S., Hoskin, D., 2004. Thy-1: More than a Mouse Pan-T Cell Marker. *J Immunol.* 173, 3581– 3588.
- Hansen, T., Rehfeld, J., Nielsen, F., 2000. Cyclic AMP-Induced Neuronal Differentiation via Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Neurochem.* 5, 1870– 1877.
- Hansen, T., Rehfeld, J., Nielsen, F., 2003. KCL potentiates forskolin-induced PC12 cell neurite outgrowth via protein kinasa A and extracellular signal-regulated kinasa signaling pathways. *Neurosci. Lett.* 347, 57– 61.
- Hendrickx, a, Bossuyt, X., 2001. Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry* 46, 336–339.
- 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. (Berl)*. 86, 1301–1314.
- Ishii, K., Katayam, M., Hori, K., Yodoi, J., Nakanishi, T., 1993. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. *Neurosci. Lett.* 163, 159– 162.
- Juhásová, J., Juhás, Š., Klíma, J., Strnádel, J., Holubová, M., Motlík, J., 2011. Osteogenic Differentiation of Miniature Pig Mesenchymal Stem Cells in 2D and 3D Environment. *Physiol. Res* 60, 559–571.
- Kadiyala, S., Young, R., Thiede, M., Bruder, S., 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells posses osteochondrogenic potencial and in vitro. *Cell Transpl.* 2, 125– 134.
- Kalcheva, N., Albala, J., Guin, K.O., Rubino, H., Garnert, C., Shafit, B., 1995. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 ( MAP-2 ) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Neurobiology* 92, 10894–10898.
- Kermani, S., Karbalaie, K., Madani, S.H., Jahangirnejad, A.A., Eslaminejad, M.B., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., 2008. Effect of lead on proliferation and neural differentiation of mouse bone marrow-mesenchymal stem cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 995–1001.
- 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, 1294–1301.
- Khang, G., Kim, H.L., Hong, M., Lee, D., 2012. Neurogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells onto  $\beta$ -mercaptoethanol-loaded PLGA film. *Cell Tissue Res.* 347, 713–24.
- Kim, W., Park, B., Sung, J., Yang, J., 2007. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 48, 15– 24.
- Kopen, G., Prockop, D., Phinney, D., 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Cell Biol. Int.* 96, 10711– 10716.
- Kozanoglu, I., Boga, C., Ozdogu, H., Sozer, O., Maytalman, E., Yazici, A.C., Sahin, F.I., 2009. Human bone marrow mesenchymal cells express NG2:

possible increase in discriminative ability of flow cytometry during mesenchymal stromal cell identification. *Cytotherapy* 11, 527–533.

- Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Bernhardt, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Germing, U., Gattermann, N., 2004. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 104, 1266–1269.
- Kumar, B.M., Maeng, G.-H., Lee, Y.-M., Kim, T.-H., Lee, J.-H., Jeon, B.-G., Ock, S.-A., Yoo, J.-G., Rho, G.-J., 2012. Neurogenic and cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from minipig bone marrow. *Res. Vet. Sci.* 93, 749–757.
- Li, N., Yang, H., Lu, L., Duan, C., Zhao, C., Zhao, H., 2007. Spontaneous expression of neural phenotype and NGF, TrkA, TrkB genes in marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 561–568.
- Liu, Y., Liu, L., Ma, X., Yin, Y., Tang, B., Li, Z., 2013. Characteristics and neural-like differentiation of mesenchymal stem cells derived from foetal porcine bone marrow. *Biosci. Rep.* 33, e00032.
- Loh, Y., Wu, Q., Chew, J., Vega, V., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K., Sung, K., Lee, C., Zhao, X., Chiu, K., Lipovich, L., Kusnetzov, V., Robson, P., Stanton, L., Wei, C., Ruan, Y., Lim, B., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431–440.
- Lu, P., Blesch, A., Tuszisnky, M., 2004. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact. *J. Neurosci. Res.* 77, 174–191.
- Mabuchi, Y., Houlihan, D.D., Akazawa, C., Okano, H., Matsuzaki, Y., 2013. Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. *Stem Cells Int.* 2013, 507301.
- Maisonpierre, P., Belluscio, L., Squinto, S., 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* (80- ). 247, 1446–1451.
- Martins, a a, Paiva, a, Morgado, J.M., Gomes, a, Pais, M.L., 2009. Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplant. Proc.* 41, 943–946.

- Mendes, S.C., Robin, C., Dzierzak, E., 2005. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development* 132, 1127–1136.
- Michalczyk, K., Ziman, M., 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* 20, 665–671.
- Mouillet-Richard, S., Laurendeau, I., Vidaud, M., Kellermann, O., Laplanche, J.-L., 1999. Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes Infect.* 1, 969–976.
- Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A., Fischer, I., 2004. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77, 192–204.
- Ni, L., Wen, Y., Peng, X., Jonakait, G., 2001. Antioxidants N -acetylcysteine ( NAC ) and 2-mercaptoethanol ( 2-ME ) affect the survival and differentiative potential of cholinergic precursors from the embryonic septal nuclei and basal forebrain: involvement of ras signaling. *Dev. Brain Res.* 130, 207–216.
- Ni, W., Yin, L., Lu, J., Xu, J., Chi, Y., Wu, J., Zhang, N., 2010. In vitro neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells. *Neurosci. Lett.* 475, 99– 103.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schoeller, H., Smith, A., 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379– 391.
- Nielsen, J.S., McNagny, K.M., 2008. Novel functions of the CD34 family. *J. Cell Sci.* 121, 4145–4145.
- Pan, K., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., HUANG, Z., Fletterick, R., Cohen, F., Prusiner, S., 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *PNAS. USA.* 90, 10962– 10966.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.-G., Liu, X.-M., Shao, Y., Ma, B.-F., Lee, J.-H., Ha, K.-S., Walton, N., Lahn, B.T., 2010. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28, 2162–2171.

- Peralta, O. a, Huckle, W.R., Eyestone, W.H., 2011. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation*. 81, 68–77.
- Petersen, B., Bowen, W., Patrene, K., Mars, W., Sullivam, A., Murase, N., Boggs, S., Greenberger, J., Goff, J., 1999. Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science* (80) 284, 1168–1172.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M., Simoneti, D., Craig, S., Marshak, D., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80). 248, 143–147.
- Platet, N., Legrand, P., Tropel, P., 2004. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.* 295, 395–406.
- Radcliffe, C., Flaminio, M., Fortier, L., 2010. Temporal Analysis of Equine Bone Marrow Aspirate During Establishment of Putative Mesenchymal Progenitor Cell Populations. *Stem Cells Dev.* 19, 269– 281.
- Raoufi, M., Tajik, P., Dehghan, M., Eini, F., Barin, A., 2011. Isolation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Bovine Umbilical Cord Blood. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 95–99.
- Reynolds, B., Tetzlaff, W., Weiss, S., 1992. A Multipotent EGF-Responsive Striatal Embryonic Produces Neurons and Astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565– 4574.
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parjefevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieckcs, I., Muceniece, R., Ancans, J., 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cells Rev.* 5, 378–386.
- Russell, K., Phinney, D., Lacey, M., Barrilleauxs, B., Meyertholen, K., O'Connor, K., 2010. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28, 788– 798.
- Sacchetti, B., Funari, A., Remoli, C., Giannicola, G., Kogler, G., Liedtke, S., Cossu, G., Serafini, M., Sampaolesi, M., Tagliafico, E., Saggio, E., Robey, P., 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 Cells Rep.* 6, 897– 913.

Safford, K., Hicok, K., Safford, S., Halvorsen, Y., Wilkison, W., Gimble, J., Rice, H., 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adiposederived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 371– 379.

Soleimani, M., Nadri, S., 2009. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat. Protoc.* 4, 102– 106.

Tao, H., Rao, R., Ma, D.D.F., 2005. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Dev. Growth Differ.* 47, 423–433.

Tatard, V.M., D’Ippolito, G., Diabira, S., Valeyev, A., Hackman, J., McCarthy, M., Bouckenoghe, T., Menei, P., Montero-Menei, C.N., Schiller, P.C., 2007. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. *Bone* 40, 360–373.

Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A., Bron, D., 2004. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation.* 72, 319–326.

Tsai, C., Su, P., Huang, Y., Yew, T., Hung, S., 2012. Article Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Mol. Cell* 47, 169–182.

Tuan, R., Boland, G., Tuli, R., 2002. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 5, 32– 45.

Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S., Young, R., Mansour, J., Caplan, A., 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full thickness defects of articular cartilage. *J. bone Jt. Surg.* 76, 579– 592.

Wells, G.A.H., Wilesmith, J.W., 1995. The Neuropathology and Epidemiology of Bovine Spongiform Encephalopathy. *Brain Pathol* 5, 91– 103.

Williams, G., Mcqueen, c., Tong, C., 1990. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Food Chem. Toxicol.* 28, 793– 798.

Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., Black, I.B., 2000. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364–370.

Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., Segal, R.A., 2000. Cell Surface Trk Receptors Mediate NGF-Induced Survival While Internalized Receptors Regulate NGF-Induced Differentiation. *J. Neurosci.* 20, 5671–5678.