



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN
TENOGÉNICA *IN VITRO* DE CELULAS MADRE
MESENQUIMÁTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSEA FETAL
EQUINA**

René Ignacio Oliva Morales

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. Oscar Peralta Troncoso, MV MSc, PhD

Departamento de Fomento de la Producción Animal

SANTIAGO, CHILE

2017

RESUMEN

Las células madre mesenquimáticas (MSC) son células multipotentes que pueden ser aisladas de diversas fuentes tisulares incluyendo médula ósea (MO) y tejido adiposo (TA). Tanto su potencial de diferenciación como la producción de factores inmunomoduladores, regenerativos, angiogénicos y antibacterianos han generado gran expectativa en el último tiempo sobre el potencial uso de las MSC para el tratamiento de enfermedades tanto en medicina humana como veterinaria. La utilización de MSC en el equino, responde principalmente a la necesidad de tratar patologías asociadas a la actividad deportiva. Las MSC provenientes de tejido adulto equino han demostrado capacidad *in vitro* de diferenciación tenogénica al ser expuestas al factor BMP-12. En el caso de MSC de origen fetal, se ha reportado que estas células poseen un mayor potencial de proliferación y diferenciación comparado con MSC obtenidas desde tejidos adultos. Sin embargo, el potencial de diferenciación tenogénica de las MSC derivadas de médula ósea fetal equina no ha sido previamente evaluado. El objetivo del presente estudio es evaluar el potencial *in vitro* de diferenciación tenogénica de MSC obtenidas de la medula ósea fetal equina. MSC provenientes de la MO fetal equina fueron sembradas a una concentración de 23×10^5 células/cm² bajo el efecto de tres dosis de BMP-12 (25, 50 y 100 ng/mL). La expresión de los genes marcadores de tendón SCX, COL1 α 1, TNMD y DCN fue evaluada los días 0 y 21. Posteriormente, se evaluó el efecto de una dosis (50 ng/mL) de BMP-12 durante el proceso de diferenciación tenogénica. En ambos experimentos no se apreciaron diferencias morfológicas tanto para células control, como tratadas con BMP-12. La expresión del marcador tenogénicos TNMD no fue detectada en MSC. En tanto, los niveles de mRNA de SCX disminuyeron ($P < 0,05$) el día 21 de cultivo tanto en MSC no expuestas a BMP-12, como en MSC tratadas con 25, 50 y 100 ng/mL de BMP-12. Los niveles de mRNA de COL1 α 1 no fueron distintos ($P > 0,05$) en MSC controles y en MSC tratadas con 25, 50 y 100 ng/mL de BMP-12. En comparación, los niveles de expresión relativa del gen DCN, aumentaron ($P < 0,05$) en MSC tratadas con 25 ng/mL de BMP-12. En la evaluación del efecto temporal se detectó una disminución ($P < 0,05$) de SCX el día 21 en comparación con el día 0 en MSC tratadas con BMP-12. La expresión relativa del gen COL1 α 1 no fue distinta ($P > 0,05$) en MSC tratadas con BMP-12 versus el control no tratado durante los 21 días de cultivo y las células de día 0. Los niveles de mRNA de DCN aumentaron ($P < 0,05$) el día 21 en MSC

tratadas con BMP-12, en comparación con el día 0. En conclusión, la suplementación con BMP-12 en MSC fetales equinas durante 21 días disminuye los niveles de mRNA de SCX, lo que a su vez no permitió activar la transcripción del gen TNMD, ni aumentar la expresión de COL1 α 1. El aumento en la expresión del marcador tenogénico DCN en MSC tratadas con BMP-12 sugiere que este factor indujo un progreso en el proceso de diferenciación hacia un estadio avanzado de diferenciación tenogénica.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells that can be isolated from diverse tissue sources including bone marrow (BM) and adipose tissue (AT). The differentiation and immunomodulatory potentials, and the production of trophic factors involved in regenerative, angiogenic and antibacterial activity have generated great expectation on the potential use of MSC for the treatment of diverse pathologies in veterinary and human medicine. The use of MSC in equine responds mainly to the need to treat pathologies associated with sports activities. MSC from adult tissue have proven the capacity for *in vitro* tenogenic differentiation when exposed to BMP-12 factor. In MSC from fetal origin it has been reported that these cells have a greater proliferation and differentiation potential compared with MSC from adult sources. However, the potential for tenogenic differentiation of MSC derived from equine foetal BM has not been previously reported. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* tenogenic differentiation potential of MSC derived from equine foetal BM. Cells were seeded at a 23×10^5 cells/cm² under the effects of three doses of BMP-12 (25, 50 and 100 ng/mL). The expression of tenogenic marker genes SCX, COL1 α 1, TNMD and DCN was evaluated at days 0 and 21. Cell morphology and relative expression of genes was evaluated at days 7, 14 and 21, as well as an immunofluorescence evaluation of COL1 α 1 on day 21. No morphological differences were observed for both control and cells treated with BMP-12. The tenogenic marker TNMD was not detected in MSC. Levels of SCX decreased ($P < 0.05$) on day 21 for both control and cells treated with 25, 50 and 100 ng/mL of BMP-12. In comparison, mRNA levels of COL1 α 1 were not different ($P > 0.05$) in MSC control and treated with 25, 50 and 100 ng/mL of BMP-12. DCN relative expression levels increased ($P < 0.05$) in MSC treated with 25 ng/mL of BMP-12. In the evaluation of the temporary effect, SCX levels decrease ($P < 0.05$) on day 21 compared to day 0 on MSC treated with BMP-12. During the 21 days of culture, COL1 α 1 relative expression was not different ($P > 0.05$) in MSC treated with BMP-12 versus the untreated control. DCN mRNA levels increased ($P < 0.05$) on day 21 in MSC treated with BMP-12 compared to day 0. In conclusion, reduction in mRNA levels of SCX after BMP-12 treatment for 21 days may have prevented the activation of the TNMD gene and the increment of COL1 α 1 expression. The increase in expression of the tenogenic marker DCN in MSC treated with BMP-12 suggests that this

factor may have induced a progress in the differentiation process until an advanced state of tenogenic differentiation.

INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, MSC) son células con capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación hacia linajes celulares mesodérmicos (Salem y Thiernemann, 2010). Se localizan en diversos tejidos como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y placenta (Dueñas *et al.*, 2014). Dado su potencial de autorenovación y diferenciación, las MSC participan en la regeneración y reemplazo de tejidos, mediante su capacidad de diferenciación principalmente hacia linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico (Caplan, 2013; Raabe *et al.*, 2013; Mohanty *et al.*, 2014; Okamura *et al.*, 2017). En el caso de MSC de origen fetal, se ha reportado que estas células poseen un mayor potencial de proliferación y diferenciación comparado con MSC obtenidas desde tejidos adultos (Zhang *et al.*, 2009). Tanto su potencial de diferenciación como la producción de factores inmunomoduladores, regenerativos, angiogénicos y antibacterianos han generado gran expectativa en el último tiempo sobre el potencial uso de las MSC para el tratamiento de enfermedades tanto en medicina humana como veterinaria.

La utilización de MSC en el equino, responde principalmente a la necesidad de tratar patologías asociadas a la actividad deportiva. Dado el tipo de actividad que realizan estos animales, hay un alto riesgo de aparición de lesiones tendinosas que ocurren en equinos de salto, principalmente en el tendón flexor digital superficial (TFDS) y el tendón flexor digital profundo (TFDP). En equinos dedicados a carreras, son frecuentes las lesiones en el TFDS, siendo esta patología causante de un 14% de eliminaciones de animales de su vida deportiva (Birch *et al.*, 2014). En ponis, las lesiones de TFDS son poco frecuentes, pero se aprecia una alta incidencia de tendinopatías del TFDP (Birch *et al.*, 2014). El tratamiento convencional de este tipo de lesiones se basa en el uso de antiinflamatorios con un nulo efecto regenerativo sobre estos tejidos (Birch *et al.*, 2014). En consecuencia, el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento basadas en el uso de fuentes celulares para uso en medicina regenerativa es de alto interés para la medicina veterinaria en equinos.

Se han reportado para la especie equina diferentes ensayos de diferenciación tenogénica utilizando MSC de individuos adultos o neonatos (Iacono *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2014; Raabe *et al.*, 2013; Violini *et al.*, 2009). Estos ensayos utilizan varios factores de crecimiento, sin embargo, uno de los más utilizados el factor BMP-12 (*Bone Morphogenic Protein-12*).

BMP-12 pertenece a un extenso grupo de factores de crecimiento filogenéticamente conservados, con más de 20 miembros identificados hasta el presente (Bragdon *et al.*, 2011). BMP-12 en humanos tiene la función de inducir la formación de ligamentos y tendones y también la función de desarrollar neuronas sensoriales a través de la estimulación de receptores que traducen su señal en una transcripción génica específica asociada a la vía de diferenciación (Bragdon *et al.*, 2011).

El uso de material fetal obtenido desde plantas faenadoras presenta la ventaja de constituir una fuente alogénica de MSC de amplia disponibilidad y que posee un menor potencial inmunogénico comparado con células derivadas de tejidos adultos (Barbierini *et al.*, 2014). En consecuencia, el objetivo general del presente estudio es evaluar el potencial *in vitro* de diferenciación tenogénica de MSC obtenidas de la medula ósea fetal equina.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MSC como potencial terapia para lesiones de tendones

Según la Sociedad Internacional para la Terapia Celular, las poblaciones de MSC humanas deben cumplir con tres requisitos para definirse como tales, que incluyen: 1) capacidad de adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar, 2) expresión de antígenos de superficie mesenquimáticos como CD105 (Endoglina), CD73 (Ecto-5' nucleotidasa), CD90 (Thy-1) y ausencia de expresión de antígenos hematopoyéticos como CD45 (Protein-tirosin-fosfatasa, receptor tipo C), CD34 (Molécula CD34), CD14 (Molécula CD14), y 3) capacidad de diferenciación multilínea hacia tipos celulares osteogénico, condrogénico y adipogénico (Dominici et al., 2006). Estos criterios mínimos pueden ser aplicados a MSC derivadas de otras especies. En la especie equina se han realizado estudios en MSC, que reportan también la capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos como osteogénico, condrogénico y tenogénico (Barbierini *et al.*, 2014; Mohanty *et al.*, 2014; Raabe *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha establecido que el potencial de diferenciación de las MSC va más allá del linaje mesodérmico, pudiendo diferenciarse hacia el linaje endodérmico (hepatogénico) y ectodérmico (neurogénico) (Lee *et al.*, 2015; Safford *et al.*, 2002). Este potencial de diferenciación hacia capas germinales distintas a la mesodérmica es conocido como plasticidad celular, sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que hayan demostrado esta capacidad bajo condiciones *in vivo* (Lee *et al.*, 2015) y no existen reportes de plasticidad de MSC en la especie equina.

Adicionalmente a la capacidad de diferenciación tenogénica de las MSC, se ha reportado un potencial de regulación de la respuesta inflamatoria a través de interacciones célula-célula y/o la secreción de factores inmunomoduladores al ambiente celular local (Borjesson y Peroni, 2011). Se ha demostrado la interacción de MSC tanto *in vivo* como *in vitro* con Linfocitos T y B, *Natural Killers* y células dendríticas (Borjesson y Peroni, 2011). Por su parte, las MSC alogénicas no inducen una respuesta inmune significativa en el receptor, en parte gracias a una menor expresión de los complejos de histocompatibilidad (MHC) I y II (Borjesson y Peroni, 2011). Las MSC equinas, al igual que las murinas y humanas expresan MHC de clase I, pero no de clase II, lo cual permite que no sean reconocidas por células inmunes y que por lo tanto sean inmunoevasivas (Borjesson y Peroni, 2011). Por lo tanto, las

capacidades de diferenciación tenogénica, inmunomoduladora y el bajo potencial inmunogénico podrían ser aspectos interesantes en la aplicación de una terapia celular basada en MSC de origen fetal.

A pesar de que los sitios de extracción de MSC son diversos y constantemente se evalúan nuevas fuentes tisulares, en general, los sitios de extracción de MSC son invasivos. En el caso de los equinos, este tipo de procedimientos requieren manejo de sedación y/o anestesia. Para la extracción de MSC desde medula ósea, los sitios de elección son la cresta ilíaca y el esternón, para lo cual se requiere de un manejo clínico que incluye la utilización de fármacos para la insensibilización y un protocolo de asepsia y posterior prescripción de antiinflamatorios (Iacono *et al.*, 2015). Estos protocolos anestésicos también deben aplicarse al extraer tejidos de otros sitios como el tejido adiposo desde la zona dorsal del glúteo (Iacono *et al.*, 2015). En este sentido, puede ser beneficioso contar con una fuente alogénica de MSC desde fetos equinos procedentes de matadero para el tratamiento de este tipo de lesiones, que permita evitar someter al paciente a intervenciones y que establezca una fuente permanente e inmediata de células para un tratamiento oportuno. Adicionalmente, las células pueden ser llevadas a una vía de diferenciación en cultivo para posteriormente ser implantadas en el paciente con el fin de ejercer el efecto terapéutico (Caplan, 2013; Dueñas *et al.*, 2014).

Potencial de diferenciación tenogénica de MSC equinas

Estudios previos han reportado la inducción tenogénica de MSC equinas mediante la suplementación del factor de crecimiento BMP-12, también conocido como GDF-7 (*Growth Differentiation Factor-7*), en concentraciones que varían desde los 10 a los 100 ng/mL (Mohanty *et al.*, 2014; Violini *et al.*, 2009; Raabe *et al.*, 2013). Se ha reportado que las células expuestas a concentraciones de 10 a 40 ng/mL de BMP-12, adquieren un cambio morfológico alrededor del día 28 de cultivo (Mohanty *et al.*, 2014). En tanto, la exposición de MSC a concentraciones de 50 ng/mL inducen un cambio morfológico alrededor del día 10 del ensayo (Mohanty *et al.*, 2014). Este cambio morfológico se evidencia como células delgadas, elongadas, con forma de huso y con procesos citoplasmáticos más delgados y largos (Mohanty *et al.*, 2014). Además, las MSC expuestas a BMP-12 aumentan los niveles de mRNA de genes asociados a tendón como MKX (*Mohawk Homeobox*), COL1a1 (Colágeno

1 alfa 1), SCX (*Scleraxis*), TNMD (Tenomodulina) y DCN (Decorina) (Mohanty *et al.*, 2014). Además de la inclusión de BMP-12, existe un ensayo con MSC provenientes de tejido adiposo donde estas células fueron cultivadas en un biorreactor diseñado para entregar estímulos mecánicos de tensión controlada (Raabe *et al.*, 2013). En este ensayo, las células resultantes, obtuvieron una mejor organización de sus fibras en un patrón más ordenado que en un ensayo en una placa de cultivo convencional (Raabe *et al.*, 2013).

Fisiología de la lesión e inflamación del tendón

En caso de lesión tendinosa se genera una respuesta inflamatoria que produce un incremento de la perfusión sanguínea, edema e infiltración de neutrófilos, macrófagos y monocitos con liberación de enzimas proteolíticas (Birch *et al.*, 2014). Esta combinación de células inflamatorias y enzimas proteolíticas está diseñada para eliminar la porción de tejido dañado, sin embargo, es usualmente excesiva para el tejido, lo que produce daño en el tendón (Birch *et al.*, 2014). Durante la fase regenerativa se produce angiogénesis y síntesis de tejido de cicatrización, que posee una composición distinta a la de un tendón normal con una mayor relación entre colágenos III/I y un mayor contenido de glicosaminoglicanos (Birch *et al.*, 2014). En la fase de remodelación, se produce un reemplazo incompleto de colágeno III por colágeno I, determinando que las nuevas fibras colágenas no posean el ordenamiento normal de un tendón sano, sino, una estructura más rígida que la original (Birch *et al.*, 2014).

Para el tratamiento de las lesiones de tendón existen variadas alternativas que van desde el uso de fármacos antiinflamatorios, crioterapia, herraje, reposo con un régimen de ejercicios enfocados en la rehabilitación y algunas alternativas quirúrgicas como la infiltración subcutánea con ácido hialurónico o el *splitting* del tendón afectado para aliviar la tensión (Gillis, 2014). Aunque, en relación con la vida del paciente, el pronóstico de estas patologías es bueno o excelente, para ser funcionales en el ámbito deportivo, requieren ser complementados con monitoreo constante y protocolos de rehabilitación (Gillis, 2014). Los tiempos empleados para las terapias de estas lesiones generalmente son largos (desde 180 hasta 300 días), lo cual, en el ámbito deportivo implica perder una temporada y aumentar el riesgo de eliminación para ese animal en caso de no poder recuperar su rendimiento (Birch *et al.*, 2014).

En base a estudios reportados anteriormente en humanos, se puede inferir que el potencial de diferenciación de MSC provenientes desde tejidos fetales es mayor que el de MSC extraídas desde tejidos adultos (Zhang *et al.*, 2009). Además, según la capacidad de diferenciación, estudios anteriores sugieren que la medula ósea fetal equina representa un potencial sitio de extracción de MSC con potencialidad de diferenciación tenogénica (Barbierini *et al.*, 2014; Violini *et al.*, 2009). El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de diferenciación tenogénica *in vitro* de MSC fetales equinas, mediante la exposición a BMP-12.

HIPÓTESIS

La suplementación de la citoquina BMP-12 al medio de cultivo induce un proceso de diferenciación tenogénico *in vitro* en MSC fetales equinas, caracterizado por un aumento en la expresión de marcadores específicos de tendón.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de diferenciación tenogénica *in vitro* de MSC fetales equinas, mediante la exposición a BMP-12.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar morfológicamente la población de MSC derivada de médula ósea fetal equina.
2. Comparar el efecto de distintas dosis de BMP-12 en el proceso de diferenciación *in vitro* tenogénico de MSC fetales equinas.
3. Evaluar el efecto en el tiempo de una dosis de BMP-12 durante la diferenciación *in vitro* tenogénica de MSC fetales equinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y aislamiento de MSC

Las MSC fueron aisladas desde un feto equino de 9 a 10 meses de gestación proveniente de una planta faenadora local. El feto fue trasladado en un contenedor térmico hasta el laboratorio. Se procedió a disecar el fémur fetal y posteriormente a seccionar la diáfisis femoral utilizando una sierra. La medula ósea fue aspirada utilizando una jeringa de 10 mL con una aguja de 18 G en un medio de colección (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) alto en glucosa Hyclone Logan, USA). El aspirado medular fue centrifugado dos veces con PBS (*Phosphate Bufffered Saline*, pH 7,4) y dos veces en medio de colección sin heparina a 1500 g por 5 minutos. Una vez lavado y centrifugado, el pellet fue suspendido en un medio de colección consistente en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina (Dueñas *et al.*, 2014). El pellet resuspendido fue incubado en placas de Petri para cultivo celular de 100 mm (Corning Inc., USA. Cat#430167) a una temperatura de 38° C, bajo una atmosfera humedecida con 5% de CO₂. Luego de dos días, las células no adheridas a las placas de cultivo fueron extraídas mediante cambio de medio. Luego del tercer pasaje, las células fueron removidas de sus placas utilizando tripsina 0,25% en 0,1% EDTA por 30 minutos a 38° C. Se realizó conteo celular utilizando una cámara de Neubauer en una muestra representativa de MSC teñidas con Azul de Trypan y posteriormente se procedió a criopreservar las células. El medio de criopreservación consistió en DMEM suplementado con 20% de SFB y 10% de Dimetilsufoxido (DMSO) más 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina. Las células fueron preservadas en alícuotas de 1 mL a una concentración de 1×10^6 células/mL en crioviales (Corning Inc., Mexico). La congelación se realizó mediante almacenamiento de los crioviales a -80° C por 24 horas y luego a -196° C en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para el proceso de descongelación, las células fueron sometidas a un baño de agua a 38° C por tres minutos. Posteriormente las MSC fueron centrifugadas durante cinco minutos a 500 g a temperatura ambiente con el objetivo de retirar el sobrenadante con DMSO. El pellet fue resuspendido en medio de cultivo y sembrado en placas de cultivo celular de 100 mm e incubado a 38° C

hasta lograr un 80% de confluencia. Para los ensayos de diferenciación, las células fueron colectadas desde el quinto pasaje.

Cultivo y diferenciación de MSC *in vitro*

Se sembraron 23×10^5 células/cm² (Violini *et al.*, 2009; Mohanty *et al.*, 2014) en medio control consistente en DMEM alto en glucosa (Corning Inc., USA) suplementado con 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin y 0,25 µg/mL de anfotericina. Inicialmente, se realizó un ensayo comparativo con tres concentraciones de BMP-12 (25, 50 y 100 ng/mL, R&D Systems, USA, #Cat: 8386-G7) más sus respectivos controles cultivados en medio sin BMP-12 durante un periodo de 21 días. Las células tratadas y los controles fueron sembrados en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning Inc., México). Para los estudios de evaluación temporal del efecto de BMP-12 durante la diferenciación tenogénica, se utilizó la dosis de 50 ng/mL, la cual en estudios previos permitió una mayor expresión de genes tenogénicos (Mohanty *et al.*, 2014). Las MSC fueron cultivadas por 21 días con cambios de medio cada tres días. La morfología celular fue evaluada mediante microfotografías con un microscopio Motic AE2000 (Motic, Xiamen, China) conectado a una cámara Moticom 5+ (Motic, Xiamen, China). Además, se colectaron muestras para PCR cuantitativo (Q-PCR) los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo, las cuales fueron fijadas en buffer RLT (*Qiagen Inc, St. Louis, USA*). Adicionalmente se colectaron muestras para inmunofluorescencia los días 0 y 21 de cultivo que fueron fijadas en 2% paraformaldehído.

PCR cuantitativo (Q-PCR)

La expresión de los niveles de mRNA de genes del linaje tenogénico SCX, TNMD, COL1 α 1 y DCN y del gen endógeno GAPDH fue analizada mediante Q-PCR. El RNA total fue extraído utilizando un kit *Genejet RNA* (Thermoscientific, USA) utilizando las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA fue determinada mediante la utilización de un kit *Qubit 3* en un fluorómetro (Thermo-Scientific, CA, USA). Se realizó la digestión del ADN genómico utilizando un kit *DNase I (RNase free)* (Thermoscientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA fue realizada y amplificada mediante

un kit *Affinity script Q-PCR cDNA Synthesis kit* (Agilent technologies, CA, USA), utilizando un termociclador TC1000-G (*SCILOGEX*, CT, USA). La reacción de PCR fue realizada utilizando un kit *Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix* (Agilent Technologies, CA, USA) y un termociclador *Eco REAL-TIME PCR SYSTEM* (Illumina, CA, USA). Cada tubo de reacción consistió en 5 μ L de *SYBR Green*, 1 μ L de primer *Foward*, 1 μ L de primer *Reverse*, 2 μ L de H₂O libre de nucleasa y 5 ng de cDNA. La cuantificación relativa de la expresión de los genes fue evaluada utilizando el método comparativo $\Delta\Delta$ CT. Los *primers* utilizados en la reacción de PCR fueron tomados como referencia de estudios previos (Raabe *et al.*, 2013; Mohanty *et al.*, 2014).

Inmunofluorescencia

Las muestras de células fijadas fueron lavadas con PBS por cinco minutos y permeabilizadas con 0.2% de Tritón X-100 por cinco minutos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en una solución de bloqueo consistente en suero de burro diluido al 10% en PBS (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA), por 30 minutos a 37° C. Luego, las MSC fueron incubadas durante toda la noche a 4° C en anticuerpos policlonales de ratón anti-COL1 α 1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, Cat.#SC-293182,), en una solución de suero de burro diluido en PBS (1:50). Al día siguiente, las MSC fueron lavadas con PBS por cinco minutos e incubadas con anticuerpo secundario IgG anti-ratón ligado a FITC (dilución en 1:400) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) en una solución de suero de burro diluido al 10% en PBS, por una hora. Posteriormente las muestras fueron montadas en medio con tinción 4',6-diamidino-2-fenililindole (DAPI; *Vectastain*, *Vector Laboratories*, Ontario, Canadá) para visualización de núcleos celulares. Una vez finalizado el protocolo, las muestras fueron guardadas a 4° C protegidas de la luz. Las muestras fueron fotografiadas utilizando un microscopio de epifluorescencia (*Olympus*, Tokio, Japón) y una cámara fotográfica conectada a un computador.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de tres repeticiones fueron expresados como media y desviación estándar. La prueba de *Shapiro Wilks* fue utilizada para evaluar la distribución normal de los datos. El modelo estadístico consideró como variable dependiente la expresión de genes, mientras que las variables independientes fueron los días en cultivo, la concentración de BMP-12 y la interacción entre las variables. Se utilizó un valor de significancia de ($P < 0.05$). Los niveles de mRNA de los genes tenogénicos SCX, TNMD, COL1 α 1 y DCN fueron analizados estadísticamente por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios para días de cultivo y tratamientos fueron determinadas utilizando el post Test de Duncan. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *Info Stat*.

RESULTADOS

Evaluación morfológica de MSC expuestas a distintas concentraciones de BMP-12

Los cultivos de MSC fueron evaluados mediante microscopía de contraste de fase para determinación de cambios morfológicos en MSC expuestas a distintas dosis de BMP-12, los días 0 y 21 de cultivo. En las células tratadas con BMP-12 como en sus controles, no se observaron diferencias morfológicas al día 21 del experimento (Figura 1). Todas las células mostraron formas fibroblásticas al ser cultivadas en monocapa aumentando su confluencia desde el día 0 al día 21.

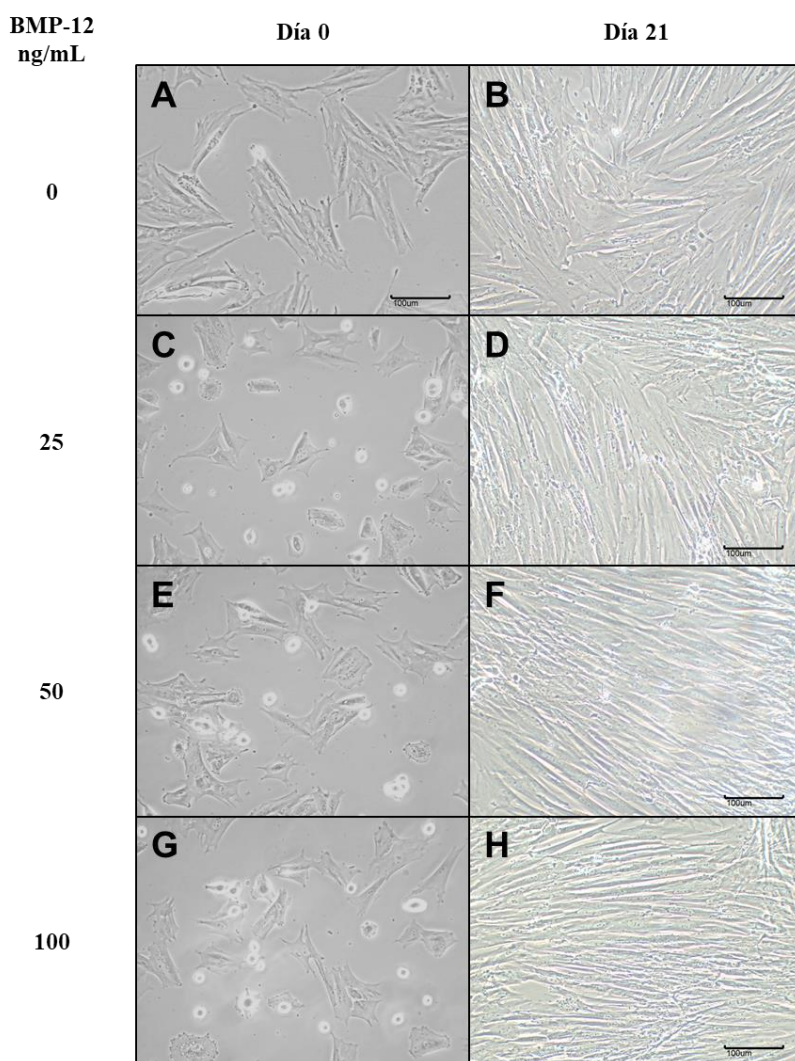


Figura 1. Evaluación morfológica de MSC equinas fetales cultivadas bajo el efecto de distintas concentraciones de BMP-12 durante 21 días de cultivo. Las células en el día 21 (B-D-F-H) expuestas a distintas concentraciones de BMP-12 (25, 50 y 100 ng/mL, respectivamente) y el control, muestran una forma de huso más elongada en comparación con las células de día 0 (A-C-E-G), las cuales presentan procesos citoplasmáticos más cortos. No se observan diferencias morfológicas para los distintos grupos experimentales en el día 21. Barra de escala=100 μ M.

Análisis de expresión relativa de marcadores tenogénicos en MSC fetales equinas expuestas a distintas concentraciones de BMP-12 por 21 días

La expresión de TNMD no fue detectada tanto en MSC controles como en células tratadas con BMP-12 en los días 0 y 21. En tanto, los niveles de mRNA de SCX disminuyeron ($P < 0,05$) el día 21 de cultivo tanto en MSC no expuestas a BMP-12 (0,24 veces el valor del Día 0), como en MSC tratadas con 25 ng/mL de BMP-12 (0,18 veces el valor del Día 0), con 50 ng/mL (0,17 veces el valor del Día 0) y con 100 ng/mL de BMP-12 (0,27 veces el valor del Día 0) (Figura 2).

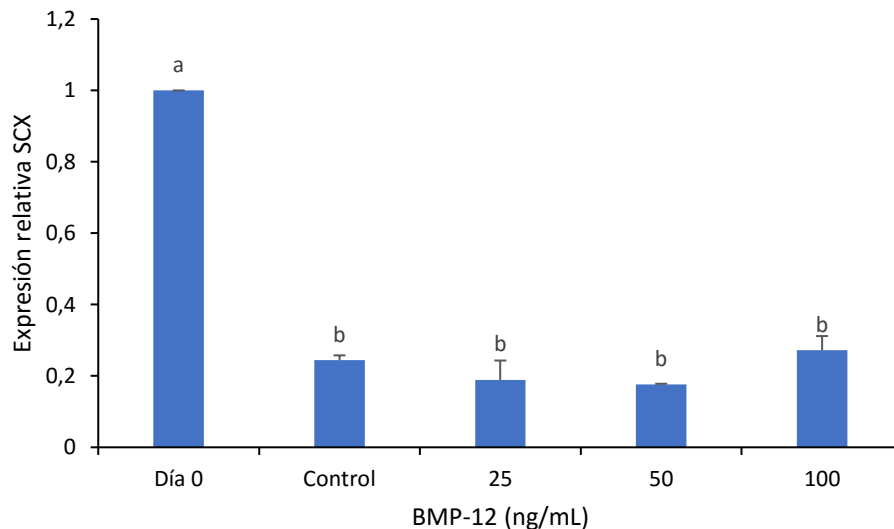


Figura 2. Niveles de mRNA de SCX en MSC fetales equinas tratadas con distintas concentraciones de BMP-12 durante 21 días de cultivo. Luego de 21 días, las células tratadas

con BMP-12 (25, 50 y 100 ng/mL) y los controles expresaron menores ($p = 0,05$) niveles de mRNA en comparación al día 0. Superíndices distintos (a, b) indican diferencias significativas entre cultivos de MSC tratados con distintas concentraciones de BMP-12.

En comparación, los niveles de mRNA de COL1 α 1 no fueron distintos ($P > 0,05$) en MSC controles (1,18 veces el valor del Día 0) y en MSC tratadas con 25, 50 y 100 ng/mL de BMP-12 (1,38; 1,09 y 1,09 veces el valor del Día 0, respectivamente; Figura 3).

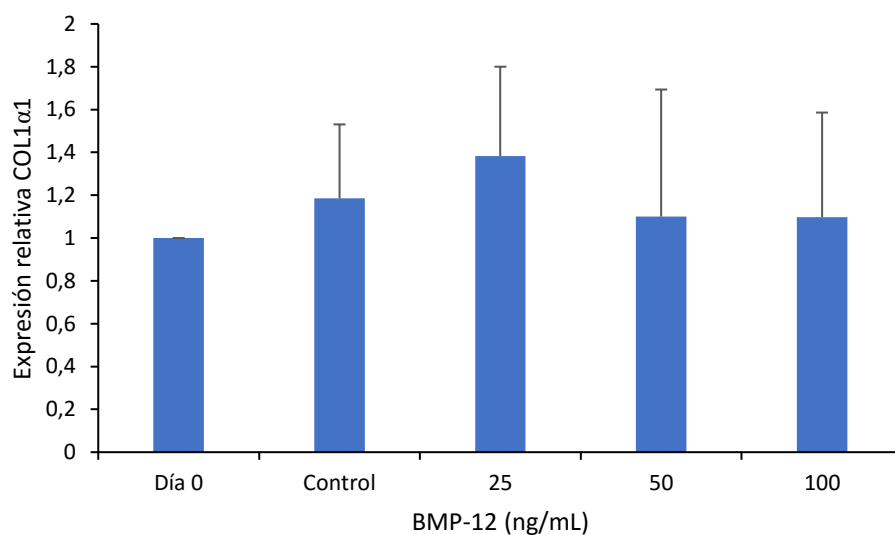


Figura 3. Niveles de mRNA de COL1 α 1 en MSC fetales equinas tratadas con distintas concentraciones de BMP-12 durante 21 días de cultivo. Los niveles de mRNA de COL1 α 1 no fueron significativamente distintos ($p = 0,05$) entre tratamiento de BMP-12 (25, 50 y 100 ng/mL) y los controles del día 21 de cultivo.

En tanto, los niveles de expresión relativa del gen DCN, aumentaron ($P < 0,05$) 5,8 veces en el control no tratado y 10,51 veces en MSC tratadas con 25 ng/mL de BMP-12 en comparación con el Día 0 y con MSC tratadas con 50 y 100 ng/mL de BMP-12 (Figura 4).

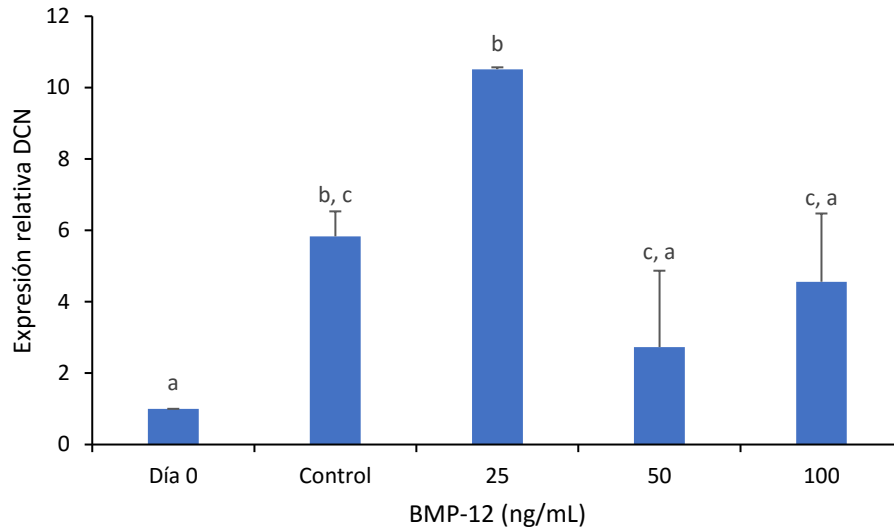


Figura 4. Niveles de mRNA de DCN en MSC fetales equinas tratadas con distintas concentraciones de BMP-12 durante 21 días de cultivo. Los niveles de mRNA de DCN fueron mayores ($P < 0,05$) en MSC controles y MSC tratadas con 25 ng/mL de BMP-12 en comparación con el Día 0 y con MSC tratadas con 50 y 100 ng/mL de BMP-12. Superíndices distintos (a, b, c) indican diferencias significativas entre cultivos de MSC tratados con distintas concentraciones de BMP-12.

Evaluación del efecto de BMP-12 durante la diferenciación tenogénica de MSC fetales equinas

Para los experimentos de evaluación temporal del efecto de BMP-12 se utilizó la concentración de 50 ng/mL, considerando como referencia estudios anteriores en los cuales esta concentración indujo un mayor aumento en la expresión de genes específicos de tendón (Mohanty *et al.*, 2014). En la evaluación morfológica de las células no se apreciaron diferencias tanto para las células control como para las tratadas con BMP-12 (Figura 5). Ambos cultivos celulares mostraron formas delgadas y elongadas las cuales se evidenciaban a partir del día 7 de cultivo, para posteriormente mantener esta forma hasta el día 21. Sin embargo, las MSC tratadas con BMP-12 alcanzaron confluencia en comparación a los controles de MSC que no fueron expuestos a BMP-12 y que no alcanzaron confluencia luego de 21 días de cultivo.

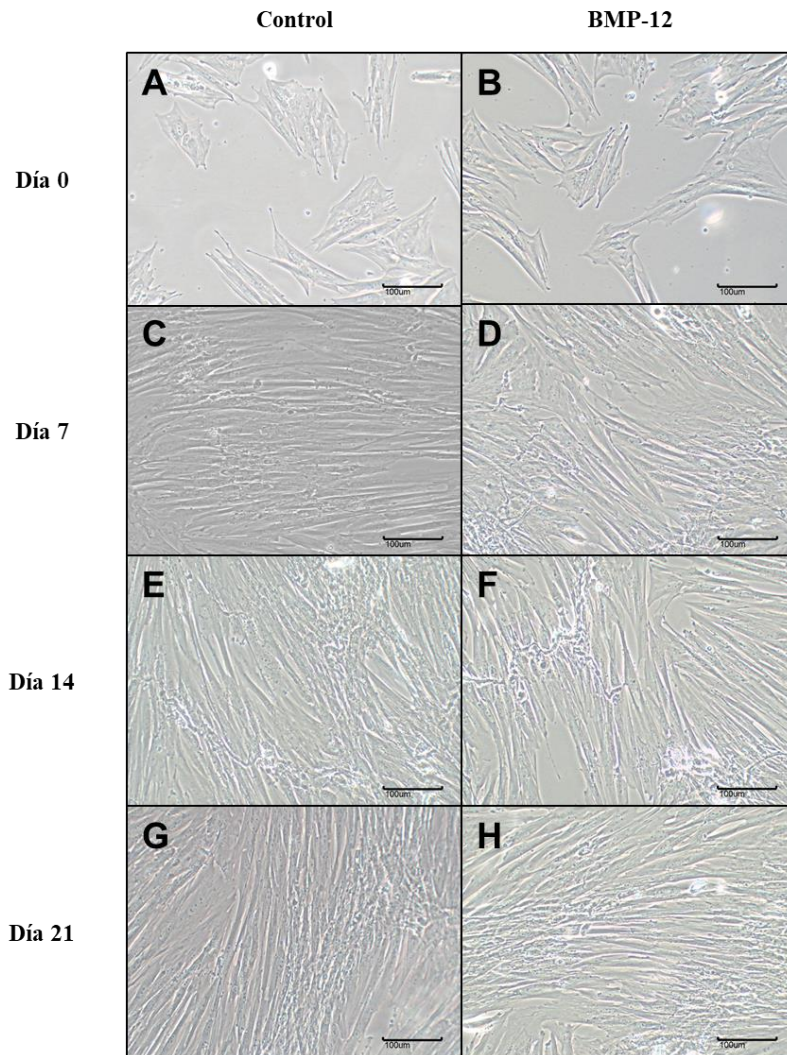


Figura 5. Evaluación morfológica de MSC equinas fetales cultivadas bajo el efecto de 50 ng/mL BMP-12 durante 21 días de cultivo. En comparación con el día 0 (A-B), desde el día 7 (C-D) se observa un aumento de la confluencia y la adquisición de formas citoplasmáticas más elongadas que se mantienen hasta el día 14 (E-F) y el día 21 (G-H). No se observaron diferencias morfológicas entre MSC controles y células expuestas a BMP-12. Barra de escala: 100 μ m.

La expresión relativa de los genes específicos de tendón fue evaluada en MSC tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BMP-12 durante 21 días de cultivo con el objetivo de determinar el efecto temporal de este factor. Los niveles de SCX disminuyeron (0,2 veces; $P < 0,05$) el día 21 en comparación con el día 0 en MSC tratadas con BMP-12, en las células control, los niveles de SCX disminuyeron (0,15 veces; $P < 0,05$) en el día 21 (Figura 6).

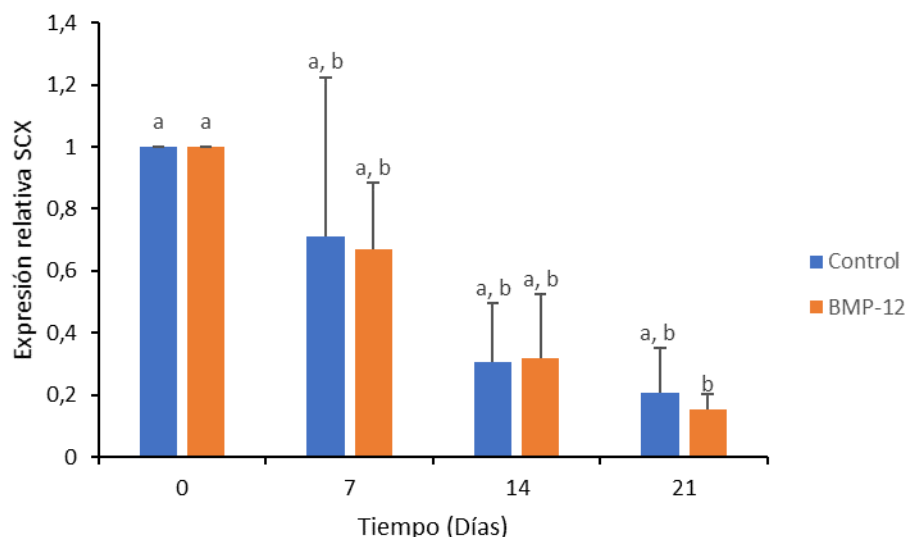


Figura 6. Niveles de mRNA de SCX en MSC fetales equinas tratadas con BMP-12 durante 21 días de cultivo. Los niveles de mRNA SCX disminuyeron significativamente el día 21 en comparación con el día 0, en cultivos de MSC tratadas con BMP-12. Superíndices distintos (a, b) indican diferencias significativas entre cultivos de MSC tratados con distintas concentraciones de BMP-12.

En tanto, la expresión relativa del gen COL1 α 1 no fue distinta ($P > 0,05$) en MSC tratadas con BMP-12 versus el control no tratado durante los 21 días de cultivo (Figura 7). Además, los niveles de mRNA en MSC tratadas y controles no fueron distintos ($P > 0,05$) en comparación con el día 0.

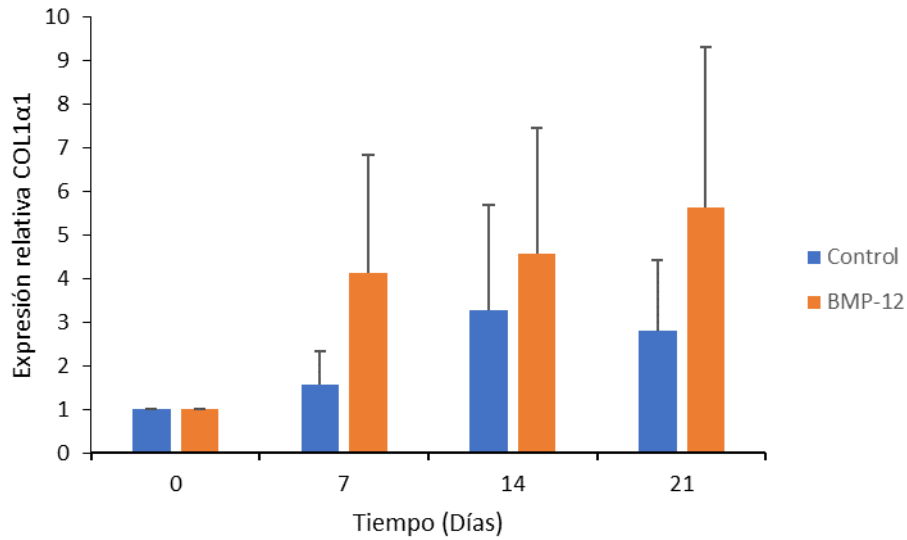


Figura 7. Niveles de mRNA de COL1 α 1 en MSC fetales equinas tratadas con BMP-12 durante 21 días de cultivo. La expresión relativa del gen COL1 α 1 no fue distinta ($P>0,05$) en MSC tratadas con BMP-12 versus el control no tratado durante los 21 días de cultivo.

En comparación, los niveles de mRNA de DCN aumentaron 62,83 veces ($P<0,05$) el día 21 en MSC tratadas con BMP-12, en comparación con el día 0 (Figura 8). Estas diferencias, sin embargo, no fueron distintas ($P>0,05$) en comparación con el control de MSC no tratado (23,41 veces la expresión del día 0).

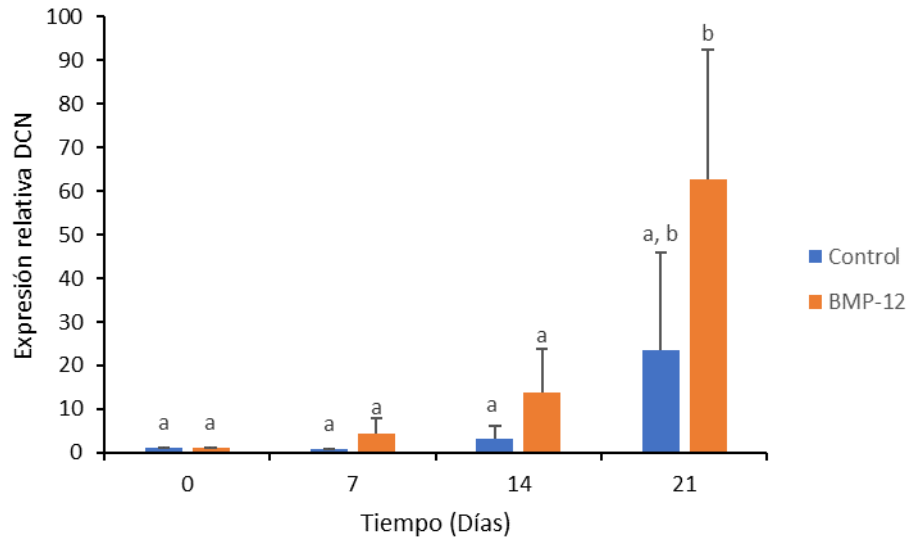


Figura 8. Niveles de mRNA de DCN en MSC fetales equinas tratadas con BMP-12 durante 21 días de cultivo. Los niveles de mRNA de DCN aumentaron ($P < 0,05$) el día 21 en MSC tratadas con BMP-12, en comparación con el día 0. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas entre cultivos de MSC tratados con distintas concentraciones de BMP-12.

Inmunodetección de COL1 α 1 en MSC tratadas con BMP-12 durante 21 días de cultivo

La expresión de COL1 α 1 fue inmunodetectada en cultivos de MSC tratadas con BMP-12 durante 21 días. La señal asociada a COL1 α 1 fue observada en agregados celulares donde se observó una mayor intensidad de fluorescencia asociada en cultivos de MSC tratados con BMP-12 en comparación con cultivos de MSC no tratados (Figura 9).

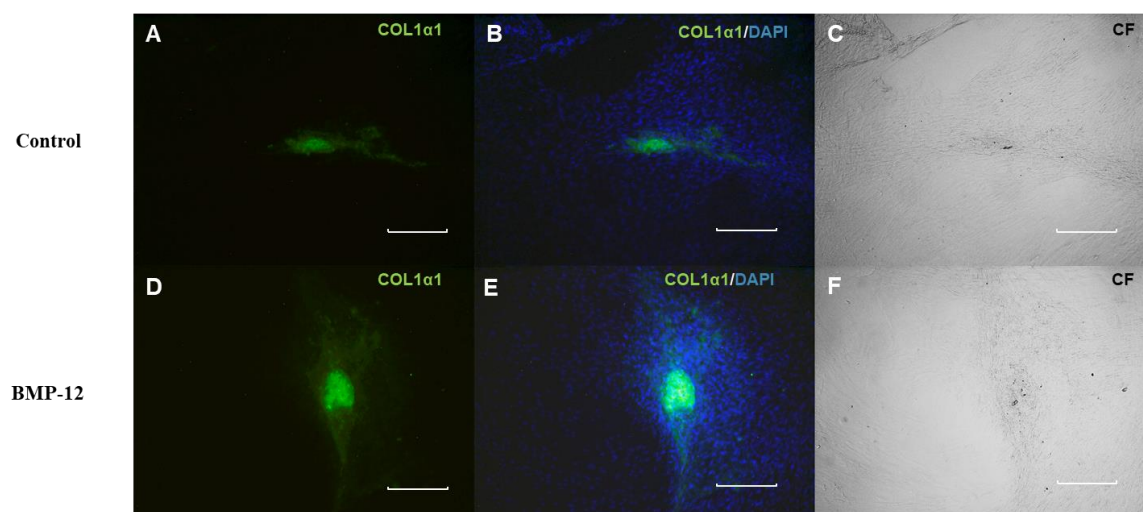


Figura 9. Inmunodetección de COL1 α 1 en MSC fetales equinas tratadas con BMP-12 durante 21 días. La señal asociada a COL1 α 1 fue observada en agregados celulares donde se encontraron mayores niveles de intensidad de fluorescencia en cultivos de MSC tratados con BMP-12 (A-C) en comparación con cultivos de MSC no tratados con BMP-12 (D-F). Barra de escala=100 μ M.

DISCUSIÓN

El aislamiento de MSC desde medula ósea fetal equina fue realizado en base a su capacidad de adherencia al plástico, como ha sido descrito previamente en numerosos estudios y como ha sido establecido por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular para la definición de cultivos de MSC (Dominicci *et al.*, 2006). La adhesión de las MSC al plástico esta mediada por la actividad de integrinas y receptores de superficie, los cuales se ligan a proteínas de la membrana extracelular como colágeno, laminina y fibronectina (Banimohamad-Shotorbani *et al.*, 2017). Esta capacidad de adherencia de las MSC no es compartida por otros tipos celulares presentes en la medula ósea como las células hematopoyéticas, lo cual permite establecer un sistema de selección y purificación de MSC (Deans *et al.*, 2000). La caracterización de las MSC fetales equinas en términos de expresión de marcadores y capacidad de diferenciación multipotente no ha sido reportada previamente. Sin embargo, las MSC equinas adultas derivadas de MO han demostrado capacidad de expresión de marcadores de superficie mesenquimáticos CD-90, CD-105 y la ausencia de antígenos hemopoyéticos CD-35 y CD-45 (Violini *et al.*, 2009; Barbierini *et al.*, 2014; Iacono *et al.*, 2015). Además, las MSC equinas derivadas de la MO de individuos adultos, han reportado potencial de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Borjesson y Peroni, 2011).

En nuestro estudio, la morfología de las MSC fetales equinas fue de huso con procesos citoplasmáticos elongados tanto por las células control como las expuestas a BMP-12. Estos cambios morfológicos son similares a los reportados previamente en MSC bajo el efecto de BMP-12 (Mohanty *et al.*, 2014). Por lo tanto, no se detectaron diferencias morfológicas importantes lo que sugiere que este factor no altera la organización del citoesqueleto celular ni la distribución de las MSC en los cultivos.

SCX es un factor de transcripción expresado por células progenitoras de tendón que regula los niveles de expresión mRNA de TNMD y COL1 α 1 (Mohanty *et al.*, 2014). Los niveles similares de expresión de SCX, tanto en células control como en células suplementadas con BMP-12, posiblemente han determinado que el mRNA de TNMD no fuera detectado y que los niveles de COL1 α 1 no fueran distintos entre MSC tratadas con BMP-12 y los controles. TNMD es una proteína de transmembrana expresada en las etapas tardías del desarrollo de

los tendones y que regula el alineamiento de fibras de colágeno tipo I (Shukunami *et al.*, 2006; Mohanty *et al.*, 2014). Es posible que la activación de la expresión de TNMD en MSC requiera una alta concentración de BMP-12, y que, por lo tanto, las concentraciones utilizadas en el presente estudio no permitieron activar la expresión de este gen. COL1 α 1 es el principal componente de la matriz extracelular en tejidos conectivos densos, los cuales poseen una estructura organizada de fibras de colágeno tipo I (Shukunami *et al.*, 2006; Mohanty *et al.*, 2014). Según lo mencionado anteriormente, dada la falta de respuesta de SCX a la suplementación de BMP-12 y como consecuencia del efecto regulador de SCX sobre COL1 α 1, es posible que la expresión de COL1 α 1 no fuera afectada por la suplementación de BMP-12.

La proteína DCN, es un pequeño proteoglicano transmembrana que es expresado por tenocitos maduros, al cual también se le asocia función en la regulación y ensamblaje de fibras colágenas y el establecimiento de las características biomecánicas (Mohanty *et al.*, 2014). En el presente estudio, se detectaron niveles de mRNA de DCN en MSC controles y tratadas con BMP-12, sin embargo, se detectó un aumento en la expresión de DCN el día 21 asociado a la suplementación de BMP-12. Estos resultados son similares a los reportados previamente (Violini *et al.*, 2009; Mohanty *et al.*, 2014) y sugieren que el efecto de BMP-12 indujo un progreso en el proceso de diferenciación hacia un estado avanzado de linaje tenogénico caracterizado por la expresión de este marcador específico de tenocito maduro.

La utilización de la dosis de 50 ng/mL de BMP-12 en las MSC fetales equinas fue utilizada con el objetivo de producir un aumento en la expresión relativa de genes tenogénicos como ha sido reportado en estudios anteriores (Mohanty *et al.*, 2014). Durante los 21 días de cultivo se produjo una disminución progresiva del gen SCX entre el día 0 y 21, alcanzando el menor valor de expresión el día 21 en células suplementadas con BMP-12. A su vez, los niveles de COL1 α 1 se mantuvieron sin variaciones durante todo el periodo de cultivo tanto en células controles como en células suplementadas con BMP-12. Estos resultados concuerdan con los primeros experimentos realizados en este estudio y confirman la hipótesis de que los niveles de mRNA de TNMD y la expresión de COL1 α 1 fueron regulados por el control de SCX que a su vez no fue afectado por la suplementación de BMP-12.

En los experimentos de efecto temporal de BMP-12 se detectó un aumento de DCN en MSC fetales equinas, con una concentración de 50 ng/mL de BMP-12. Sin embargo, en los experimentos de efecto dosis-respuesta de BMP-12 se detectó aumento en la expresión de DCN el día 21 de cultivo con una concentración de 25 ng/mL de BMP-12. En estudios anteriores que utilizaron 25 ng/mL de BMP-12 se ha reportado un aumento en la expresión de DCN en MSC adultas el día 28 de cultivo (Mohanty *et al.*, 2014). Es posible que el desfase en el tiempo de activación de DCN luego del efecto de BMP-12 se deba al origen tisular de las MSC. Esto debido a que el potencial de diferenciación de las MSC de origen fetal es mayor a las de origen adulto dado que la expresión de genes de multipotencia está asociado a la ontogenia de las células (Zhang *et al.*, 2009).

En cultivos de MSC fetales equinas, la inmunodetección de COL1 α 1 fue observada principalmente sobre agregados celulares, con una mayor intensidad en células suplementadas con BMP-12. La diferencia en intensidad entre cultivos de MSC tratadas con BMP-12 y no tratadas no fue representado por los niveles de mRNA de COL1 α 1, dado que no se detectaron diferencias significativas entre MSC tratadas con BMP-12 y controles. Sin embargo, se presume que esta mayor intensidad en la señal de COL1 α 1 en MSC tratadas podría ser explicada por el aumento de la expresión de DCN y su rol sobre el ordenamiento de las fibras colágenas, donde se presentaría una distribución diferente en MSC suplementadas con BMP-12 en comparación con células control (Mohanty *et al.*, 2014).

Debido a su fácil aislación, cultivo y a la capacidad de adquirir un fenotipo distinto al ser expuestas a un determinado factor de diferenciación, el presente estudio propone que las MSC fetales equinas poseen potencial para el tratamiento de lesiones de tendón en equinos. Sin embargo, la evaluación de potencial terapéutico de las MSC equinas fetales requiere de estudios posteriores *in vivo* que permitan determinar el real efecto regenerativo o reparativo que estas células pueden tener en lesiones de tendón.

CONCLUSIÓN

La suplementación con BMP-12 en MSC fetales equinas durante 21 días disminuye los niveles de mRNA de SCX, lo que a su vez no permite activar la transcripción del gen TNMD, ni aumentar la expresión de COL1 α 1. El aumento en la expresión del marcador tenogénico DCN en MSC tratadas con BMP-12 sugiere que este factor indujo un progreso en el proceso de diferenciación hacia un estadio avanzado de diferenciación tenogénica.

BIBLIOGRAFÍA

BANIMOHAMAD-SHOTORBANI, B.; ALIZADEH, E.; SALEHI, R.; BARZEGAR, A. 2017. Adhesion of mesenchymal stem cells to biomimetic polymers: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 71. 1192-1200.

BARBIERINI, D.; PAIVA-FREITAS, N.; MAGNONI, M.; MAIA, L.; LISTONI, A.; HECKLER, M.; SUDANO, M.; GOLIM, M.; LANDIM-ALVARENGA, F.; AMORIM, M. 2014. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *J Stem Cell Res Ther.* 5(1): 25.

BIRCH, H.; SINCLAIR, C.; GOODSHIP, A.; SMITH, R. 2014. Tendon and ligament physiology. **In:** Hindclif, K, W.; Kaneps, A.; Geor, R. *Equine sports medicine and surgery.* 2nd ed. Elsevier. Londres, Inglaterra. pp: 167-188.

BORJESSON, D.; PERONI, J. 2011. The regenerative medicine laboratory: Facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clin Lab Med.* 31(1): 109-123.

BRAGDON, B.; MOSEYCHUK, O.; SALDANHA, S.; KING, D.; JULIAN, J.; NOHE, A. 2011. Bone Morphogenetic Proteins: A Critical Review. *Cell Signal.* 23 (4): 609-620.

CAPLAN, A. 2013. Cell sources for tissue engineering: Mesenchymal stem cells. **In:** Ratner, B.; Hoffman, A.; Schoen, F.; Lemons, J. *Biomaterials sScience.* Third Edition. Elsevier. Canada. pp.1159-1164.

DEANS, R.; MOSELEY, A. 2000. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 28: 875-884.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, DJ.; HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8(4): 315-7.

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

GILLIS, C. 2014. Soft Tissue injuries: tendinitis and desmitis. **In:** Hindclif, K, W.; Kaneps, A.; Geor, R. *Equine Sports Medicine and Surgery.* 2nd Ed. Elsevier. Londres, Inglaterra. pp: 399-418.

IACONO, E.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; ROSSI, B.; RICCI, F.; SPADARI, A. 2015. Equine bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: Cytofluorimetric characterization, in vitro differentiation, and clinical application. *J Equine Vet Sci.* 35: 130-140.

LEE, S-W.; MIN, S-O.; BAK, S-Y.; HWANG, H-O.; KIM, K-S. 2015. Efficient endodermal induction of human adipose stem cells using various concentrations of Activin A for hepatic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 464 (4): 1178-1184.

MOHANTY, N.; GULATI, B.; KUMAR, R. 2014. Immunophenotypic characterization and tenogenic differentiation of mesenchymal stromal cells isolated from equine umbilical cord blood. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 50(6): 538-548.

OKAMURA, I.; CORDERO, P.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; TORRES, O.; PERALTA, O.; 2017. Myogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from fetal bovine bone marrow. *Anim Biotechnol.* 7: 1-11.

RAABE, O.; SHELL, K.; FIETZ, D.; FREITAG, C.; OHRNDOF, A.; CHRIST, H.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. 2013. Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions. *Cell Tissue Res.* 352(3): 509-521.

SALEM, H.; THIEMERMANN, C. 2010. Mesenchymal Stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 28(3): 585-596.

SAFFORD, K.; HICOK, K.; SAFFORD, S.; HALVORSEN, Y-D.; WILKINSON, W.; GIMBLE, J.; RICE, H. 2002. Neurogenic differentiation of murine and adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 371-379.

SHUKUNAMI, C.; TAKIMOTO, A.; ORO, M.; HIRAKI, Y. 2006. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol.* 298: 234-247.

VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L.; GORNI, C.; MARIANI, P. 2009. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol.*10: 29.

ZHANG, Z-Y.; TEOH, S-W.; CHONG, M.; SCHANTZ, J.; FISK, N.; CHOOOLANI, M.; CHAN, J. 2009. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 27(1): 126-137.