



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

**AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN HEPATOGÉNICA
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS
DESDE MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

Víctor Ignacio Becerra Ivanovic

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

PROFESOR GUÍA: OSCAR PERALTA TRONCOSO

Universidad de Chile

FONDECYT N° 11100205

SANTIAGO, CHILE
2013



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

**AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN HEPATOGÉNICA
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS
DESDE MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

Víctor Ignacio Becerra Ivanovic

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ÓSCAR PERALTA T.
PROFESOR CONSEJERO: MONICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO: IGNACIO ARIAS F.

FONDECYT N° 11100205

SANTIAGO, CHILE
2013

Memoria de Título

“Aislamiento y diferenciación hepatogénica de células madre mesenquimales obtenidas desde médula ósea fetal bovina”

“Isolation and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells obtained from bovine fetal bone marrow”

Victor I. Becerra I. ¹, Lic. Med. Vet., Universidad de Chile.

¹ Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. victorbecerraivanovic@gmail.com

Financiamiento Proyecto Fondecyt N 11100205

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are undifferentiated cells with high proliferative capacity and potential for differentiation into various mesodermal cell lines including osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. Recent reports indicate that MSC possess further capacity of differentiation into non-mesodermal cell lineages including hepatogenic. The aim of this study was to induce the *in vitro* hepatogenic differentiation of MSC isolated from fetal bovine bone marrow. MSC were isolated based on their adherence to plastic from bone marrow aspirates derived from bovine fetuses (n = 3) and then cultured *in vitro* under hepatogenic conditions for a 28-day period. Expression of liver-specific genes Albumin (*ALB*) and α -Fetoprotein (α -*FP*), pluripotency gene *NANOG* and metabolic production of hepatic glycogen, Urea and Albumin were analyzed during this period. Analysis by quantitative PCR (Q-PCR) detected an increase ($P < 0.05$) in the expression of *ALB* and α -*FP* (331 and 60 times the value of day 0, respectively) in differentiated MSC at 28 days of culture. At this stage, higher levels of Albumin (1213 versus 232.9 mg/ml in control) and Urea (8.2 versus 5.5 mg/dl in control) were detected in differentiated MSC cultures. α -FP and glycogen were also detected in differentiated MSC. These results indicate that MSC isolated from fetal bovine bone marrow possess potential for hepatogenic differentiation under *in vitro* conditions.

Keywords: Bovine, Mesenchymal stem cells, pluripotency, hepatogenic differentiation.

Resumen

Las células madre mesenquimales (CMM) son células indiferenciadas con alta capacidad proliferativa y de diferenciación multipotente hacia líneas celulares mesodérmicas que incluyen osteocitos, condrocitos y adipocitos. Estudios recientes indican que las CMM poseen adicionalmente capacidad de diferenciación hacia linajes celulares no mesodérmicos como el hepatogénico. El objetivo del presente estudio fue inducir diferenciación *in vitro* hepatogénica de CMM aisladas desde médula ósea fetal bovina. Las CMM fueron aisladas en base a su adherencia al plástico desde médula ósea aspirada desde fetos bovinos (n=3) y posteriormente cultivadas *in vitro* bajo condiciones hepatogénicas por un periodo de 28 días. Durante este periodo se analizó la expresión de los genes hepato-específicos Albúmina (*ALB*) y α -Fetoproteína (α -*FP*), de pluripotencia *NANOG* y la producción de metabolitos hepáticos Glicógeno, Urea y Albúmina. El análisis por PCR cuantitativo (Q-PCR) permitió detectar un aumento ($P < 0,05$) en la expresión de *ALB* y α -*FP* (331 y 60 veces el valor del día 0, respectivamente) en CMM diferenciadas el día 28 de cultivo. En esta etapa también se detectaron mayores ($P < 0,05$) niveles de Albúmina (1213 versus 232,9 μ g/ml del control) y Urea (8,2 versus 5,5 mg/dl del control) en cultivos de CMM diferenciadas. La presencia de la proteína α -FP y de Glicógeno también fue detectada en estas células. Estos resultados indican que las CMM aisladas desde médula ósea fetal bovina poseen potencial de diferenciación hepatogénico bajo condiciones *in vitro*.

Palabras clave: Bovino, Células madre mesenquimales, pluripotencia, diferenciación hepatogénica.

1 Introducción

El término Célula Troncal o Madre (CM) es utilizado para referirse a un tipo celular altamente indiferenciado, con capacidad de autorenovación y de diferenciación en varios tipos celulares. Este término fue utilizado por primera vez por Ernst Haeckel, quien realizó una alusión evolutiva a la célula primordial de la cual se originaron todas las células y organismos pluricelulares (Young y Black, 2004). Posteriormente los histoembriólogos Theodor Boveri y Valentin Haecker establecieron características definitivas de las células madres, como su capacidad de auto-regeneración y diferenciación hacia células somáticas, distanciándose de su anterior uso vernácula (Young y Black, 2004). Las CM pueden clasificarse según su potencialidad para originar distintas líneas celulares y según su tejido de origen. En la primera clasificación se encuentran las CM totipotentes con potencial capacidad de originar cualquier tipo celular incluyendo un organismo completo. Las CM pluripotentes son capaces de originar células pertenecientes a los tres linajes embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) y las CM multipotentes poseen un potencial de diferenciación que se restringe a células de un mismo linaje embrionario. Adicionalmente, se han descrito CM unipotentes con capacidad de diferenciación limitada a un solo tipo celular (Lei *et al*, 2013). Dependiendo del origen durante el desarrollo, las CM se pueden clasificar en células madre embrionarias o células madre adultas. Estas últimas están presentes en todos los tejidos, conformando un nicho celular responsable de su crecimiento y regeneración (Lei *et al*, 2013). Dentro de las células madre adultas se encuentran las llamadas células madres mesenquimales que se originan en la capa embrionaria mesodérmica y que poseen capacidad de diferenciación multipotente.

1.1 Células Madre Mesenquimales (CMM)

Las CMM fueron descritas por primera vez en 1976 por el patólogo Alexander Fridenstein quien las caracterizó como células de morfología fibroblastoide, adherentes al plástico y con capacidad clonogénica (formación de colonias desde una célula) (Fridenstein *et al.*, 1976). Actualmente, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha establecido los siguientes criterios para la denominación de células madre mesenquimales: 1) capacidad de adherencia al plástico, 2) fenotipo

positivo a marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, y negativo a marcadores de linaje hematopoyético CD34, CD45 y CD19 y 3) capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Violini *et al.*, 2009).

Las CMM cumplen un importante rol en la reparación y regeneración en variados tipos de tejidos como médula ósea, tejido adiposo, folículo piloso, placenta y cordón umbilical (Banas *et al.*, 2007). Las CMM provenientes desde estos tejidos comparten similar morfología celular y marcadores de superficie pero poseen variados potenciales de aislamiento, proliferación y diferenciación (Lei *et al.*, 2013). La médula ósea ha sido descrita como el mayor reservorio de CMM multipotentes, donde se estima que la proporción de estas células varía entre 0,001 y 0,01% de la población celular en un individuo adulto (Pitinger *et al.*, 1999; Christodoulou *et al.*, 2013). Se ha reportado que el potencial de proliferación y diferenciación es aún mayor en CMM obtenidas desde médula ósea fetal comparado con el estado adulto (Romanov *et al.*, 2003). Numerosos estudios recientes sugieren que las CMM derivadas desde médula ósea son capaces de dar origen a un rango aún más amplio de tipos celulares incluyendo no mesenquimales como hepatocitos, neuronas, células epiteliales y queratinocitos (Ayatollahi *et al.*, 2012). Debido a la plasticidad de las CMM para originar múltiples líneas celulares y la posibilidad de usar fuentes autólogas de CMM (evitando la incompatibilidad entre el donante y el receptor de las células), estas células han emergido como una fuente prometedora para regeneración de tejidos. En el caso de la diferenciación hepatogénica, se ha descrito que poblaciones de células derivadas de médula ósea de rata (células progenitoras adultas multipotentes o MAPC) son capaces de diferenciarse *in vitro* bajo condiciones de diferenciación hepatogénica hacia un tipo celular con morfología, fenotipo y características funcionales similares a hepatocitos (Schwartz *et al.*, 2002). Más aún, en el caso de estudios *in vivo*, se ha descrito que ante la ocurrencia de un daño hepático de importancia, las CMM migran desde la médula ósea hacia el órgano dañado, donde se diferencian hacia hepatocitos (Tokcaer-Keskin *et al.*, 2009).

La investigación en la línea de diferenciación y regeneración hepatogénica alcanza una mayor importancia si se considera que 20 millones de personas en el mundo padecen de cirrosis y/o cáncer hepático y que menos del 30 % de los pacientes en la lista de espera de donantes recibe órganos (Banas *et al.*, 2007). En consecuencia, la

medicina regenerativa basada en CMM se ha transformado en una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades y desordenes metabólicos hepáticos (Ghaedi *et al.*, 2011). Para alcanzar esta finalidad, es necesario contar con más fuentes de información o modelos de experimentación para CMM. El modelo bovino constituye una abundante fuente de material biológico, considerando en este caso la amplia disponibilidad de médula ósea que existe en animales vivos o faenados para la obtención de CMM. Además, las CMM bovinas poseen características similares a las de otras especies como la humana, haciéndolas una atractiva herramienta para el desarrollo de estudios sobre fisiología y aplicación clínica (Bosnakovski *et al.*, 2005). En el caso de la Medicina Veterinaria, la utilización de este tipo de biotecnología podría tener un gran impacto considerando la alta ocurrencia de patologías hepáticas en animales de compañía y producción.

1.2 Desde célula madre mesenquimal al hepatocito

La capacidad de diferenciación de las CMM es dependiente del microambiente *in vivo* o de las condiciones de cultivo *in vitro*. En este sentido los factores inductores de diferenciación más importantes corresponden a factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de la matriz extracelular. Si bien existe una gran cantidad de publicaciones relacionadas con el potencial de diferenciación *in vitro* de hepatocitos a partir de CMM derivadas de varias especies, aún existen grandes discrepancias sobre el rol que juegan los distintos inductores en el proceso de diferenciación (Birchmeier, 1995; Forte *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2008; Chivu *et al.*, 2009; Ayatollahi *et al.*, 2012; Wu y Tao, 2012). En este sentido, se ha reportado la utilización del factor de crecimiento hepatocítico ("hepatocyte growth factor", HGF), factor de crecimiento epidermal ("Epidermal growth factor" o EGF), oncostatina M (OSM) y dexametasona. (Lee *et al.*, 2004; Snykers *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2010). El HGF es una citoquina de origen mesenquimal que promueve la migración, supervivencia y regeneración celular, inhibiendo la apoptosis de las CMM y aumentando el porcentaje de supervivencia de las células bajo condiciones *in vitro* (Ayatollahi *et al.*, 2011). Además, este factor resulta esencial en el desarrollo epitelial de varios órganos y es una de las citoquinas más caracterizadas por su estimulación de la síntesis de ADN en cultivos primarios de hepatocitos (Birchmeier *et al.*, 1995). El EGF también juega un rol importante en la proliferación y diferenciación de hepatocitos ya que promueve la mitosis en las etapas

tempranas de la regeneración hepática (Skarpen *et al.*, 2005). La OSM es un miembro de la familia de interleuquinas 6, producidas por las CMM durante etapas tempranas de la embriogénesis. Se ha descrito la actividad de este factor como inductor de diferenciación en células hepáticas fetales, induciendo la producción de enzimas metabólicas del hígado adulto como glucosa-6-fosfatasa y tirosina-amino-transferasa (Miyajima *et al.*, 2000). Se considera en consecuencia que su efecto es crítico para la maduración de los hepatocitos. Finalmente, la dexametasona es un glucocorticoide sintético que actúa en la inducción de enzimas relacionadas con la gluconeogénesis en el hígado (Lindroos *et al.*, 1991). Además se describe que promueve la expresión fenotípica del hepatocito, suprimiendo la producción de α -Fetoproteína (α -FP) y la síntesis de ADN, lo cual inhibe la división celular y fomenta la producción de Albúmina (Miyajima *et al.*, 2000; Chivu *et al.*, 2009).

1.3 Determinación del fenotipo y genotipo hepatogénico

En su microambiente hepático, la apariencia del hepatocito varía dependiendo del estado fisiológico del animal. En fase de ayuno, su morfología puede presentarse como una célula de tamaño reducido con citoplasma turbio y poco delineado. En cambio, durante la fase postprandial se presenta como una célula de gran tamaño con citoplasma bien delineado y con numerosas inclusiones de lípidos o glicógeno (Dieter *et al.*, 1998). El núcleo es único y esférico y se ubica en el centro de la célula aunque en ciertas ocasiones ésta puede ser binucleada y se describe gran cantidad de mitocondrias, lisosomas y ribosomas en su citoplasma (Dieter *et al.*, 1998). Se ha reportado que CMM humanas cultivadas bajo condiciones de diferenciación hepatogénica *in vitro*, presentan durante la primera semana de cultivo un ligero cambio en la morfología desde una forma fibroblástica a una apariencia plana y posteriormente su morfología cambia significativamente adoptando una forma poligonal o cúbica con presencia de numerosos gránulos en el citoplasma hasta el día 28 de cultivo (Seo *et al.*, 2005). A pesar de los cambios morfológicos antes descritos, se ha reportado que al final del cultivo en condiciones de diferenciación, las CMM no adquieren una morfología típica de hepatocito (Seo *et al.*, 2005; Kosmacheva *et al.*, 2011).

La diferenciación hepática *in vitro* de CMM se puede caracterizar por medio de la detección y cuantificación de la expresión de genes marcadores que codifican proteínas sintetizadas por hepatocitos como la Albúmina (ALB) y la α -Fetoproteína (α -FP) (Lee *et al.*, 2004; Ayatollahi *et al.*, 2011). Existen varias técnicas para detectar esta expresión como PCR cuantitativo (Q-PCR) o inmunofluorescencia. Ambas técnicas son rápidas, reproducibles y específicas pero se diferencian en su sensibilidad donde el Q-PCR supera a la inmunofluorescencia indirecta.

La ALB es la proteína más abundante sintetizada exclusivamente por hepatocitos funcionales. Su expresión ocurre tempranamente en el hígado desde la segunda mitad de la embriogénesis manteniéndose en el estado fetal y adulto (Shiojiri, 1981). Por otra parte, la α -FP es una proteína producida por el hígado y el saco vitelino. Su síntesis ocurre desde un estado temprano de desarrollo embrionario y durante todos los estadios fetales disminuyendo progresivamente su expresión hasta desaparecer completamente en la vida adulta (Cascio *et al.*, 1991). Además de los métodos ya mencionados, se puede reconocer la función del hepatocito mediante la detección o cuantificación de la síntesis de productos y/o metabolitos resultantes de sus procesos biológicos específicos. Como ejemplo de esto, se pueden mencionar la secreción de ALB, producción de Urea y almacenamiento de Glicógeno (Lee *et al.*, 2004; Banas *et al.*, 2007; Ayatollahi *et al.*, 2011).

Como ya se ha mencionado anteriormente las CMM son multipotentes por lo que poseen la capacidad de generar más de un tipo celular perteneciente al linaje mesenquimal. En las CM embrionarias la mantención de esta multipotencialidad es regulada por factores de transcripción como NANOG, SOX2 y OCT4 (Lei *et al.*, 2013; Pierantozzi *et al.*, 2011). Además de ayudar a mantener la multipotencialidad, NANOG permite conservar la capacidad de expansión de las CM tras reiterados pasajes celulares (Go *et al.*, 2007). Sin embargo, el comportamiento de este gen durante el proceso de diferenciación celular ha sido poco estudiado en CMM. La presencia de este gen está ligado a células altamente indiferenciadas lo que se considera un indicador de pluripotencialidad celular (Birchmeier *et al.*, 1995).

Considerando los antecedentes antes expuestos, se planteó como hipótesis para el presente estudio que el cultivo de CMM bajo condiciones *in vitro* de diferenciación

hepatogénica induce la pérdida de la expresión del marcador de pluripotencia NANOG conjuntamente con la aparición de la expresión de marcadores hepato-específicos ALB y α -FP y la producción de metabolitos hepáticos como Glicógeno, Urea y Albúmina. Se considera como objetivo del presente estudio el aislamiento de CMM desde médula ósea fetal bovina y su posterior diferenciación hacia el linaje hepatogénico bajo condiciones *in vitro*.

2 Material y métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio del Proyecto Fondecyt 11100205 del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET-UCH). Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

2.1 Obtención y cultivo de CMM

La médula ósea se obtuvo desde fetos bovinos de siete a nueve meses de gestación (n=3) desde un matadero local. Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico al laboratorio. Los fémures fetales fueron separados de tejidos blandos y seccionados en la diáfisis utilizando una sierra. La médula ósea fue aspirada mediante una bránula de 18 G conectada a una jeringa de 10 mL conteniendo medio de colección constituido por DMEM alto en glucosa (# SH30002.02; "Dulbecco's Modified Eagle Medium", Thermo Scientific, Utah, USA) suplementado con 1000 UI de heparina, 100 μ g/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina (# SV30010; Thermo Scientific, Utah, USA). La médula ósea obtenida fue centrifugada dos veces en solución fosfato salina tamponada (# AP-9009-10; "Phosphate buffered saline", PBS) (pH 7,4) y dos veces en medio de colección sin heparina a 500 XG por cinco minutos. Una vez lavado, el sedimento fue aspirado y suspendido en medio de cultivo (DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (# SH30559.03; SFB, Hyclone, Utah, USA) para su posterior cultivo en frasco (T75, Falcon, New Jersey, USA) a 38,5 °C bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de dos días de

cultivo, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio de cultivo y lavado con PBS.

Posteriormente, las CMM se sembraron en medio control o diferenciación con una densidad de 3000 células por cm^2 en placas de 25 cm^2 . El medio control consistió en DMEM bajo en glucosa (# SH30021.9; Thermo Scientific) suplementado con 5 % SFB, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina y 100 UI/ml penicilina y 100 UI/ml de anfotericina B (# SV30078.01; Thermo Scientific, Utah, USA). Las CMM se cultivaron en medio control por una semana y posteriormente en medio control sin SFB por tres semanas. El medio de diferenciación consistió en 57,5% DMEM (bajo en glucosa) y 37,5% MCDB-201 (# 1001076991; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado con 1x ITS (# 354352; BD Biosciences, Bedford, USA), 1 nM de dexametasona, 0,1 mM de ácido ascórbico 2-fosfato, 10 ng/mL EGF recombinante humana (# 354001; BD Biosciences, California, USA), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina y 100 UI/ml penicilina, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B y 5% SFB por una semana. Posteriormente, las CMM se cultivaron en medio de diferenciación suplementado con 0,1% dimetil sulfoxido (# 317275; DMSO, Calbiochem, Massachusetts, USA), 10ng/ml HGF recombinante humana (# H5791; BD Biosciences) y 10ng/ml OSM recombinante humana (# H6541; BD Biosciences) por tres semanas, sin SFB y sin EGF.

Las muestras de células en cultivo se obtuvieron cada semana desde cada grupo (control o diferenciación) y se fijaron en 500 μL de buffer RLT (# 79216; QIAGEN Inc., California, USA) suplementado con 5 μL de β -mercaptoetanol (# M6250; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para análisis por Q-PCR. Además se recolectó cada semana 1000 μL —del medio de cultivo de cada placa de control o diferenciación para cuantificación de Albúmina y Urea. Los Cultivos de CMM al día 28 de diferenciación fueron fijadas en 4% Paraformaldehído para análisis por tinción ácido periódico de Schiff, (PAS).

2.2 PCR-Cuantitativo

La expresión de genes hepato-específicos α -FP y ALB y de pluripotencia NANOG fue analizada mediante Q-PCR. Para esto se fijaron muestras los días 0, 7, 14, 21 y 28 de cultivo tanto en CMM control como diferenciación. El RNA total fue aislado utilizando

un minikit RNAeasy (# 74104; QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se cuantificó mediante el uso de espectrofotometría. El ADN complementario (cDNA) fue sintetizado y amplificado mediante un kit Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Brilliant II SYBR Green RT-PCR (# 600559; Stratagene, CA, USA) utilizando un termociclador Step One (Applied Biosystems, CA, USA). La reacción de PCR se realizó utilizando un "kit" Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (# 600828; Stratagene, La Jolla, CA) y un termociclador Step One (# 4377742; Applied Biosystems, California, USA). Cada tubo de reacción consistió en 12,5 µl de Master Mix, 200nM de partidores, 0,375 µl de tinción de referencia ROX, 2 µl de cDNA y agua hasta alcanzar un volumen final de 25 µl. La expresión relativa de α -FP, ALB y NANOG fue calculada en relación a la expresión del gen endógeno GAPDH utilizando el método $\Delta\Delta$ Ct. Las secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en q-PCR se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de partidores utilizados en Q-PCR.

GEN		SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS (5' – 3')	PARES DE BASES (bp)
ALB	Forward	TTTTCTCAGTATCTCCAGCAGT	364
	Reverse	AGTAGGGATGTCTTCTAGCAAT	
α -FP	Forward	CTTGTTGCTTACACAAAGAAGG	309
	Reverse	ATGGAAGATGAACTTGTCTATCG	
NANOG	Forward	GTGTTTGGTGAAGTCTCCTG	308
	Reverse	GGGAATTGAAATACTTGACAG	
GAPDH	Forward	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	127
	Reverse	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	

2.3 Inmunofluorescencia

Se analizó la presencia de la proteína α -FP en CMM cultivadas bajo condiciones de control y diferenciación por inmunofluorescencia indirecta. Para esto las CMM fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 min y lavadas con PBS tres veces durante cinco minutos, posteriormente se permeabilizaron con Triton al 0.1% por 10 minutos. A continuación las CMM fueron lavadas tres veces con PBS durante cinco minutos.

Luego las CMM fueron incubadas en una solución de bloqueo consistente en suero de burro al 10% durante 30 minutos y luego lavadas tres veces con PBS por cinco minutos. Luego, las CMM fueron incubadas con anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -FP diluido en suero de burro (1:50) por 24 horas. Después de tres lavados en PBS por cinco minutos, las CMM se incubaron por 45 minutos con anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con FITC y diluido en suero de burro (1:100). Posteriormente las CMM fueron lavadas tres veces con PBS durante cinco minutos y montadas en medio con DAPI (# H-1200; 4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectastain, Vector Lab, Ontario, Canadá) para tinción de ADN. Las muestras fueron fotografiadas utilizando un microscopio de epifluorescencia conectado a una cámara fotográfica E400 (Olympus, Tokyo, Japón).

2.4 Determinación de metabolitos de funcionalidad hepatogénica

Almacenamiento de Glicógeno

El glicógeno intracelular en CMM diferenciadas y controles fue analizado por medio de tinción PAS (Periodic Acid-Schiff) el día 28 de cultivo. Para esto, las CMM controles y diferenciadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Luego las CMM fueron lavadas tres veces durante 3 minutos con agua desionizada (dH_2O). Posteriormente, las células fueron incubadas con ácido periódico al 0,5% por cinco minutos a temperatura ambiente y nuevamente lavadas tres veces por tres minutos con agua bidestilada. Luego las CMM fueron mantenidas en solución de Schiff durante 15 minutos a temperatura ambiente. Esta solución reacciona con el Glicógeno intracelular otorgándole un color violeta que permite evaluar cualitativamente su presencia en el cultivo celular. Luego las CMM fueron lavadas tres veces durante tres minutos con dH_2O . Finalmente el núcleo celular fue teñido con Hematoxilina de Mayer por un minuto y se observó la muestra mediante microscopía de campo claro.

Producción de Urea

La concentración de Urea secretada por las CMM en el medio de cultivo control y diferenciación en los días 0, 7, 14, 21 y 28 fue cuantificada a través espectrofotometría utilizando el método de la Urea cinética. Este método se basa en la hidrólisis de la Urea por parte de la Ureasa, la cual origina amonio y dióxido de carbono. El amonio en presencia de glutamato deshidrogenasa y cetoglutarato oxida el NADH a NAD⁺. Esta última reacción fue medida por espectrofotometría como una disminución de su absorbancia, la que es proporcional a la concentración de Urea en la muestra. Para esto se utilizó el kit de Urea cinética (# K056; Bioclin, Quibasa Quimica Basica Ltda, Santa Branca, Brasil) siguiendo las instrucciones del fabricante. El método consistió en la combinación de 800 µL del reactivo número uno (glutamato deshidrogenasa, Ureasa y tampón tris) con 200 µL del reactivo número dos (NADH) y 10 µL de la muestra. Las reacciones se extendieron por 3 minutos y posteriormente se midió la disminución de la absorbancia a través de espectrofotometría.

Secreción de Albúmina

La concentración de Albúmina secretada por las CMM en el medio de cultivo control y diferenciación los días 0, 7, 14, 21 y 28 fue cuantificada a través espectrofotometría utilizando el método verde de bromocresol. Este método se basa en la combinación de la Albúmina presente en la muestra con el verde de bromocresol en pH 4,1, donde se produce un cambio de color del indicador (de amarillo verdoso a verde azulado) proporcional a la concentración de Albúmina presente en la muestra. Para esto se utilizó el kit de verde de bromocresol (# 11547; Biosystem S. A., Barcelona, España) el cual requiere mezclar 1 ml del reactivo 1 (Tampón acetato (100 mmol/L), verde de bromocresol (0,27 mmol/L) y solución detergente (pH 4,1) con 10 µl de la muestra (medio de cultivo del día respectivo). La reacción se extiende por 1 minuto a temperatura ambiente y el cambio de coloración se mide a través de espectrofotometría.

3.5 Análisis estadístico

Los datos de un mínimo de tres repeticiones independientes se evaluaron y expresaron como media y desviación estándar. Los datos de expresión relativa de α -FP, ALB, NANOG y de concentración de Albúmina y Urea fueron analizados mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilks. Posteriormente los efectos de los días de cultivo y de tratamiento fueron evaluados por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios para días de cultivo y tratamientos fueron determinadas por medio del post test LSD de Fisher. Se utilizó un valor de significancia ($P < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Info Stat (Córdoba, Argentina, 2008).

3 Resultados

Morfología Celular

Los cambios morfológicos en cultivos de CMM control y diferenciación registrados mediante fotografías cada 7 días durante un periodo total de cultivo de 28 días, se muestran en la Figura 1. Luego de ser sembradas en botellas de cultivo, las CMM adquirieron una morfología típica fibroblástica que se mantuvo hasta el día 7 en ambos tratamientos. A partir del día 7 de cultivo, las CMM diferenciadas adquirieron una forma triangular. A pesar de que las CMM no fueron cuantificadas durante este período, fue posible apreciar una mayor proliferación celular en las CMM diferenciadas comparadas con el control, alcanzando un 100% de confluencia el día 10 de cultivo. El día 14, la monocapa de CMM diferenciadas se desprendió de la botella de cultivo y se mantuvo en suspensión con apariencia de membrana macroscópica hasta el día 28. Se pudo apreciar un bajo número de células que se mantuvieron adheridas a la placa de cultivo. A partir del día 21 y hasta el término del cultivo (día 28) se observaron cambios significativos en la morfología y distribución de las CMM diferenciadas. Estas células adquirieron una forma piramidal y menos elongada, además de exhibir una agrupación celular tridimensional. En cambio, las CMM controles alcanzaron confluencia deteniendo su proliferación y manteniendo su forma fibroblástica.

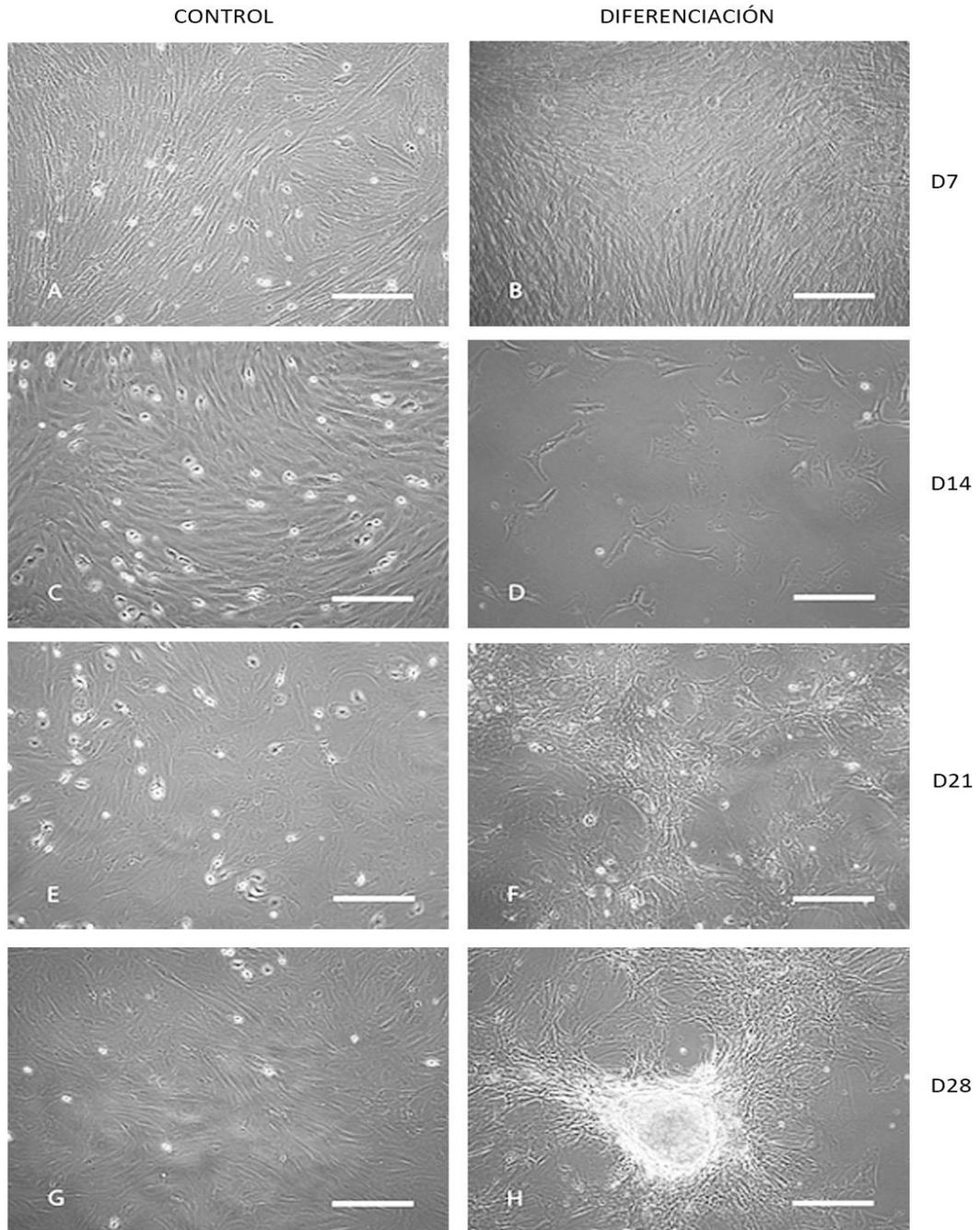


Figura 1 Fotografías de CMM fetales bovinas durante 28 días de cultivo bajo diferenciación hepatogénica. A, C, E y G corresponden al tratamiento control obtenidas los días 7, 14, 21 y 28, respectivamente. B, D, F y H pertenecen al tratamiento de diferenciación para los días 7, 14, 21 y 28, respectivamente. En esta secuencia fotográfica se puede apreciar diferencias en la cantidad, morfología y agrupación celular, especialmente hacia el día 28 de cultivo. Barra de escala= 200 μ m.

El proceso de diferenciación hepatogénica fue caracterizado por medio de la cuantificación de la expresión relativa de los genes hepato-específicos *ALB* y α -*FP*. Las muestras para Q-PCR fueron obtenidas los días 0, 7, 14, 21 y 28 de cultivo para los tratamientos de diferenciación y de control (Figura 2). No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de *ALB* entre CMM control y diferenciadas los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo. Sin embargo, el día 28 se detectó mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA de *ALB* (331 veces el valor expresado el día 0) en CMM diferenciadas comparado con el control.

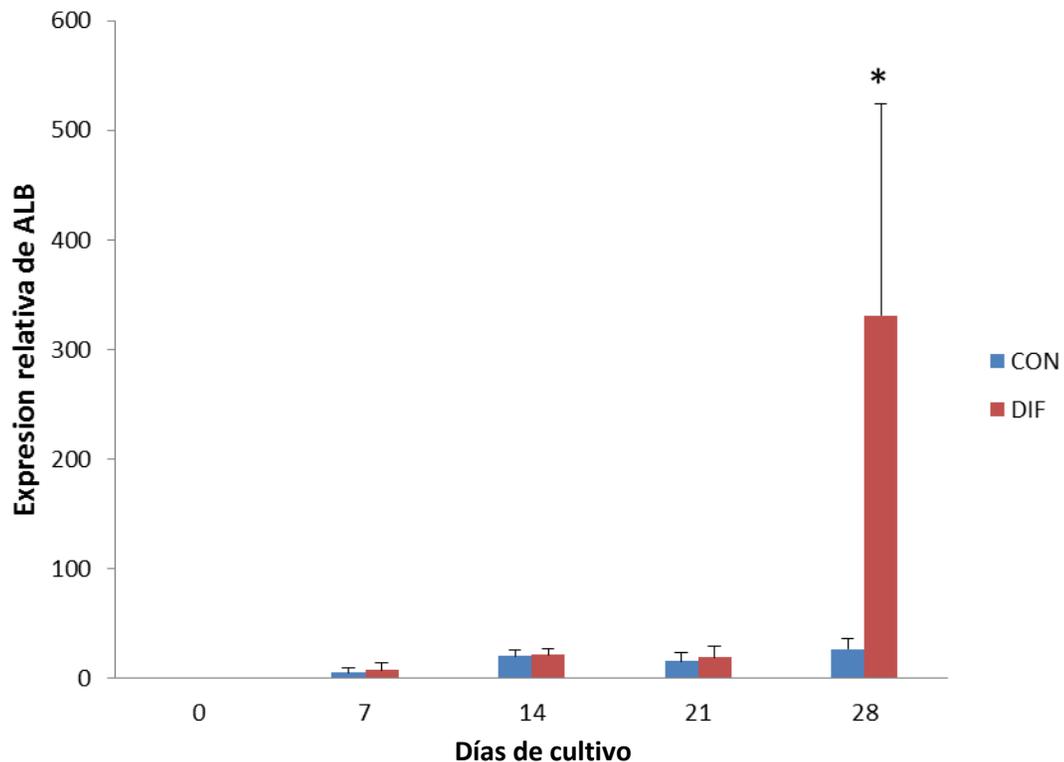


Figura 2 Expresión relativa de ARNm de *ALB* en CMM bovinas cultivadas por 28 días en medio de cultivo hepatogénico. Se detectó un valor más alto de expresión relativa de *ALB* en CMM diferenciadas (DIF) (331 veces el valor expresado el día 0) comparado con control (CON) el día 28 de cultivo. Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$) en relación al control y al día 0 de cultivo.

El análisis mediante Q-PCR, no permitió detectar expresión de ARNm de α -*FP* en CMM controles o tratamientos hasta el día 21 de cultivo. El día 21 de cultivo no se detectaron diferencias en los niveles de ARNm de α -*FP* entre ambos tratamientos. Sin

embargo, el día 28 de cultivo se cuantificó una mayor ($P < 0,05$) expresión relativa de α -FP en CMM diferenciadas (60 veces el valor del día 0) en comparación al control (Figura 3).

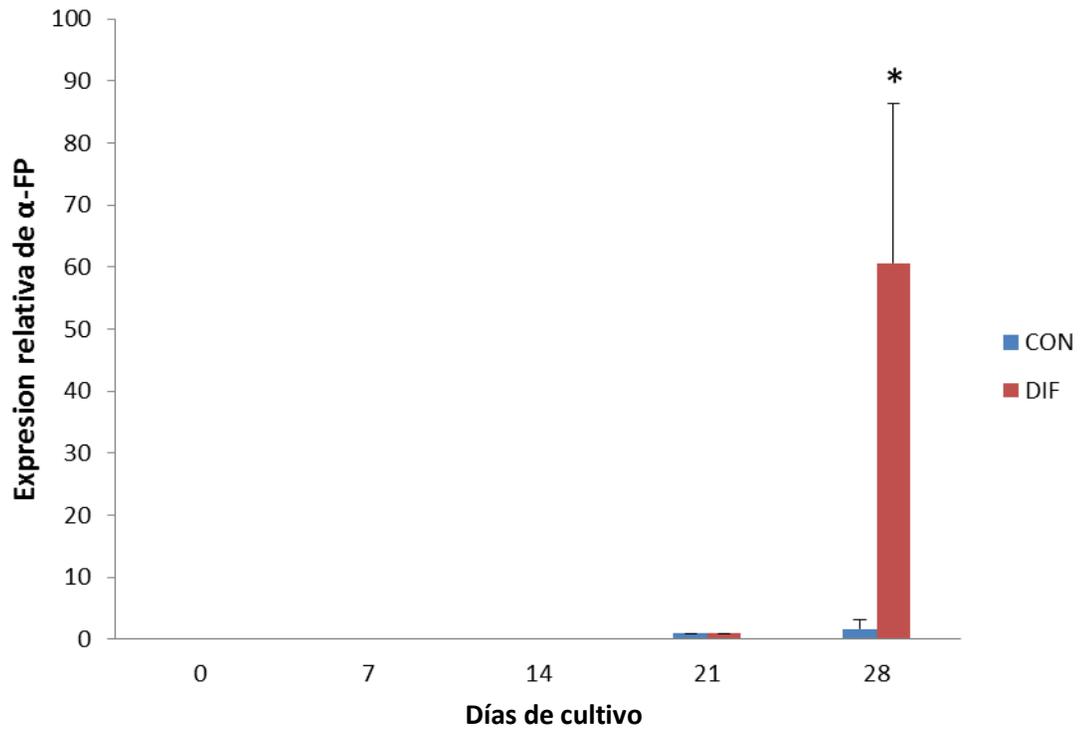


Figura 3 Expresión relativa de α -FP en CMM fetales bovinas cultivadas por 28 días en medio de cultivo hepatogénico. Se detectó un valor más alto en la expresión relativa de α -FP en CMM diferenciadas (DIF) comparado con control (CON) el día 28 de cultivo. Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$) en relación al control y al día 0 de cultivo.

La cuantificación del gen *NANOG* se realizó con el objetivo de medir el grado de pluripotencia de las CMM durante el proceso de diferenciación hepatogénica (Figura 4). Se observó en el tratamiento control un aumento en la expresión relativa de *NANOG* llegando a su valor máximo el día 14 del tratamiento (8 veces la expresión del día 0). Los niveles de *NANOG* fueron menores ($P < 0,05$) en CMM diferenciadas en comparación con el control el día 21 de cultivo.

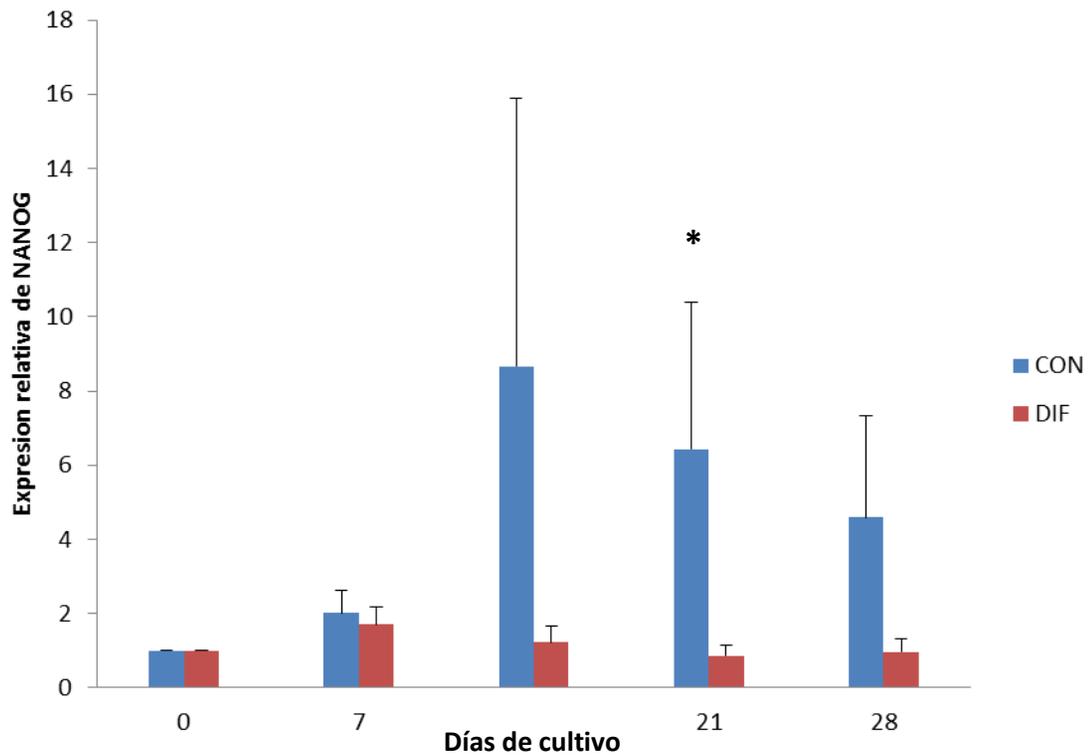


Figura 4 Expresión relativa de *NANOG* en CMM bovinas cultivadas en medio hepatogénico por 28 días. Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$) en la expresión relativa el día 21 del tratamiento control en relación a diferenciación y al día 0 de cultivo.

3.1. Inmunofluorescencia.

La expresión de la proteína α -FP fue detectada a través de inmunofluorescencia en CMM diferenciadas y control el día 28 de cultivo (Figura 5). Se observó fluorescencia asociada a α -FP en cultivos de CMM diferenciadas pero no en los controles.

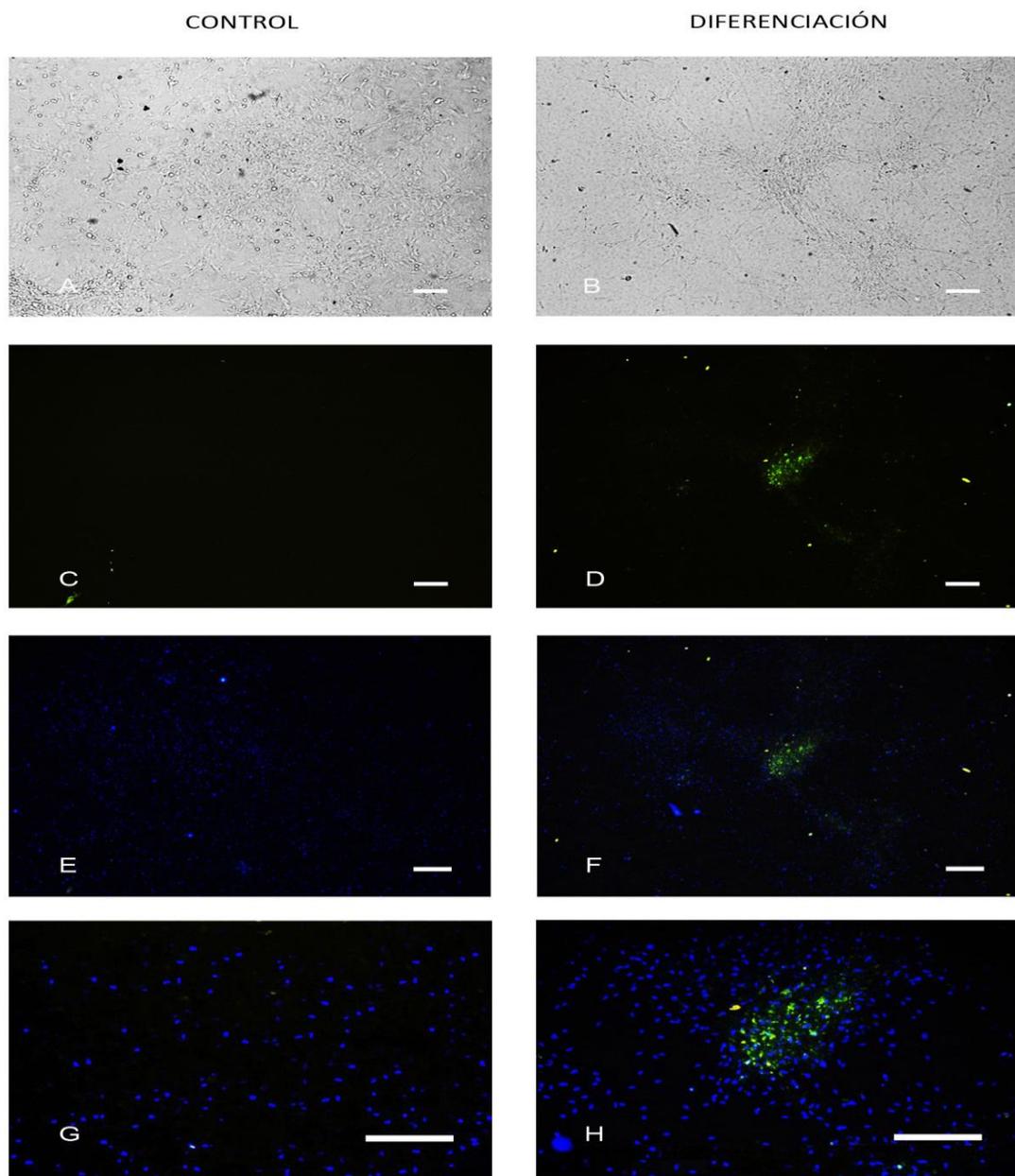


Figura 5 Inmunofluorescencia asociada a α -FP en CMM bovinas cultivadas en medio hepatogénico por 28 días. A, C, E y G corresponden a CMM control (CON). B, D, F y H corresponden a CMM diferenciadas (DIF). A y B fueron obtenidas mediante microscopía de contraste de fase. C, D, E, F, G y H fueron obtenidas mediante microscopía epifluorescente. El color verde corresponde a inmunofluorescencia asociada a α -FP y el color azul a inmunofluorescencia específica de DAPI. Se puede observar una mayor fluorescencia específica en el tratamiento diferenciación, específicamente asociada a agregados celulares. Barra de escala= 200 μ m.

3.2. Determinación de metabolitos de funcionalidad hepática

Almacenamiento de Glicógeno

Se analizó el almacenamiento de glicógeno intracelular en CMM diferenciadas y controles mediante el uso de la tinción PAS el día 28 de cultivo (Figura 6). En el análisis histoquímico se pudo observar una coloración violeta de mayor intensidad en cultivos de CMM diferenciadas en comparación con los cultivos controles. Esta coloración se asocia a un mayor almacenamiento de glicógeno intracelular, especialmente en agregados celulares.

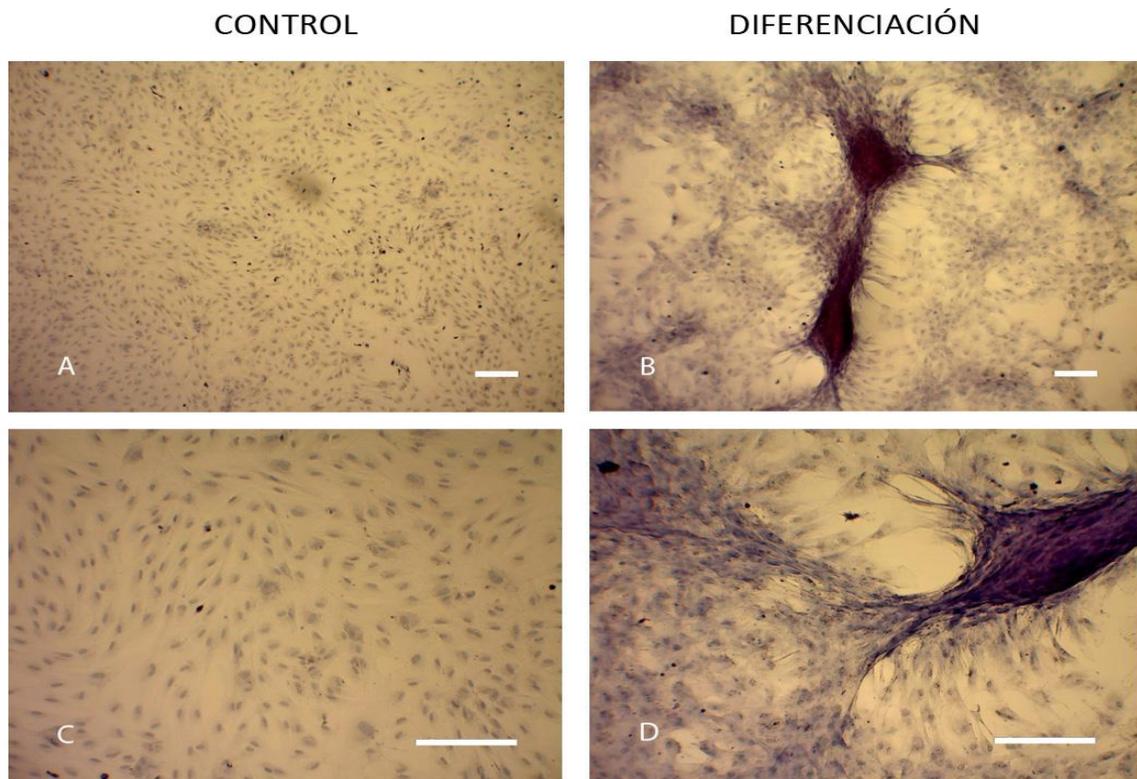


Figura 6 Almacenamiento de glicógeno intracelular en CMM fetales bovinas cultivadas en medio hepatogénico por 28 días. Las imágenes A y C corresponden a cultivos de CMM control. Las imágenes B y D corresponden a cultivos de CMM diferenciación. Se pueden apreciar diferencias en la intensidad de tinción entre ambos tratamientos, especialmente en agregados celulares. Barra de escala = 200 μ m.

Producción de Urea

Para evaluar la producción de Urea se colectó medio de cultivo desde ambos tratamientos (control y diferenciación) los días 0, 7, 14, 21 y 28. Posteriormente, el medio de cultivo fue sometido a la prueba de Urea cinética con el fin de medir la concentración Urea. Desde el día 21 hasta el día 28 se detectó una mayor ($P < 0,05$) producción de Urea en CMM diferenciadas (7,27 y 8,2 mg/dl, respectivamente) comparado con los controles (4,7 y 5,5 mg/dl respectivamente).

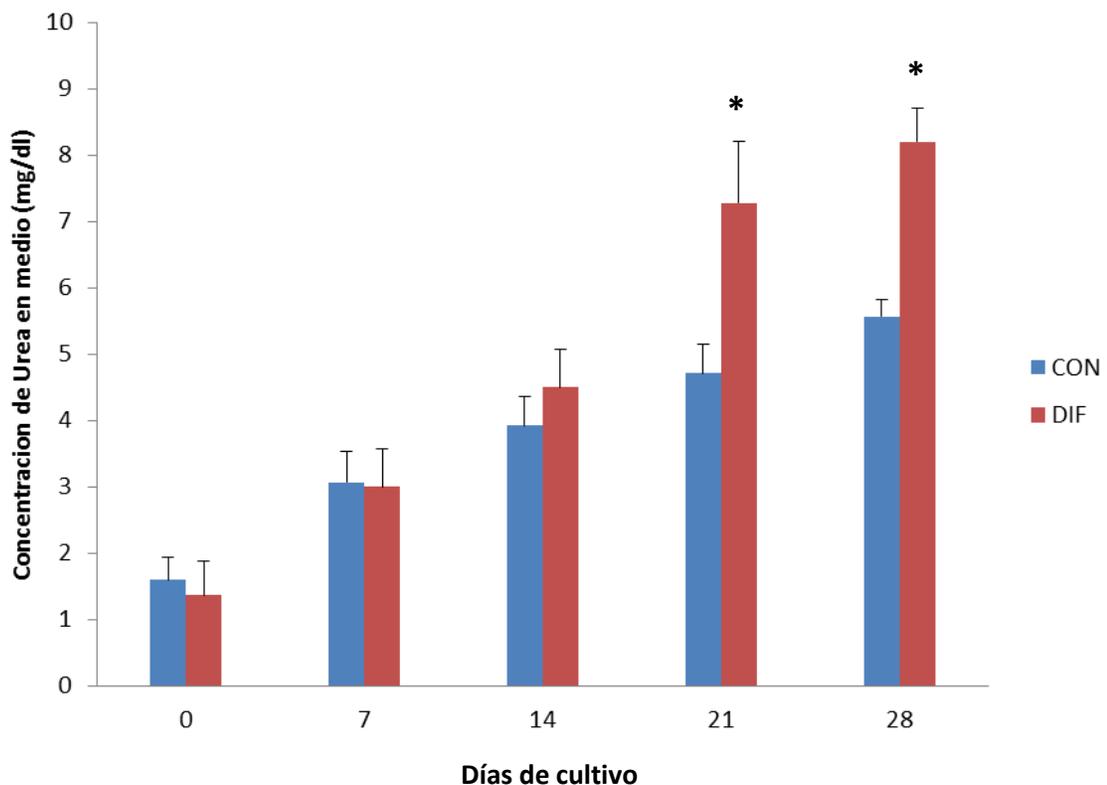


Figura 7 Concentración de Urea en medio de cultivo de CMM fetales bovinas bajo diferenciación hepatogénica por 28 días. Los niveles encontrados los días 21 y 28 en los medios de cultivo de CMM diferenciadas (DIF) fueron mayores ($P < 0,05$) en comparación con los valores obtenidos en medios de cultivo de CMM control (CON). Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores obtenidos de ambos tratamientos.

Secreción de Albúmina

La producción de Albúmina se cuantificó en el medio de cultivo de CMM diferenciadas y control los días 0, 7, 14, 21 y 28. Fue posible detectar niveles de Albúmina en el medio de cultivo desde el día 0. El día 28 de cultivo se detectaron mayores ($P < 0,05$) niveles de Albúmina en cultivos de CMM sometidas a diferenciación comparado con controles (1213 y 232 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) (Figura 8).

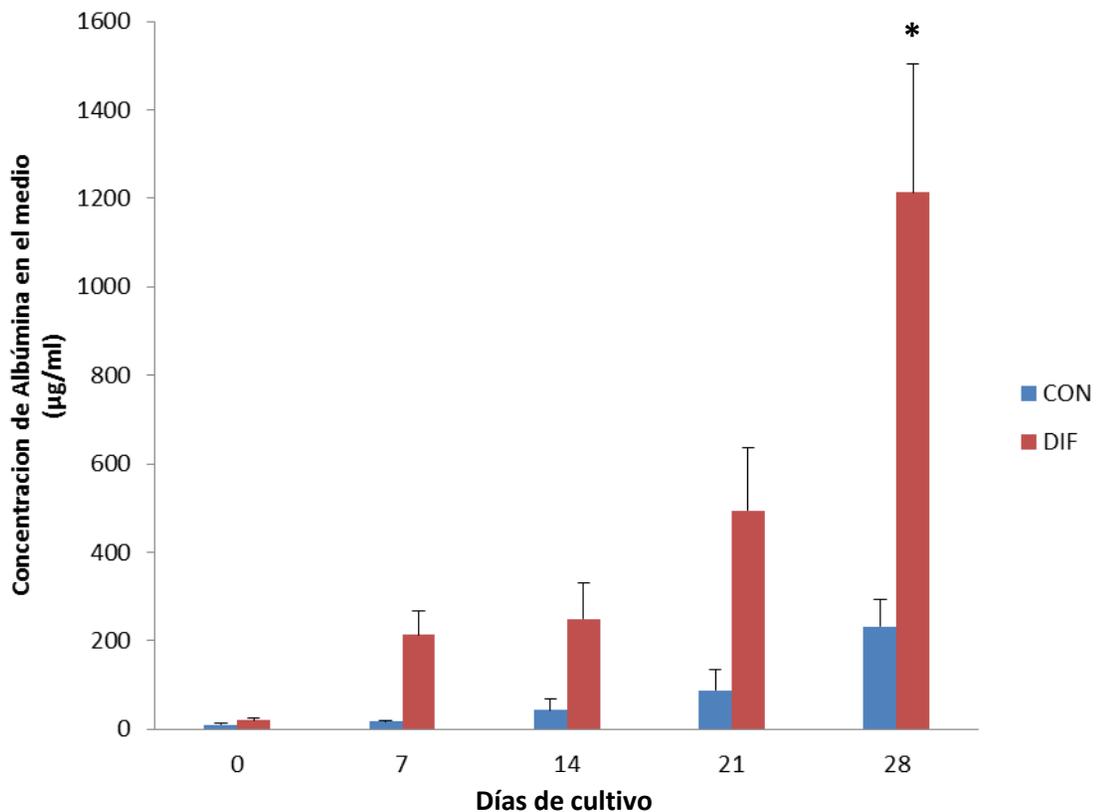


Figura 8 Concentración de Albúmina en medio de cultivo de CMM fetales bovinas cultivadas bajo condiciones de diferenciación hepatogénica por 28 días. Se observan niveles más altos de Albúmina en cultivos de CMM diferenciadas (1213 $\mu\text{g/ml}$) comparado con el control (232 $\mu\text{g/ml}$) el día 28 de cultivo. Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores obtenidos de ambos tratamientos.

4 Discusión

En el presente estudio fue posible realizar el aislamiento de CMM desde medula ósea fetal bovina y su posterior diferenciación hepatogénica luego de cultivo in vitro por un período de 28 días. La caracterización del fenotipo hepatogénico fue realizada mediante determinación de la morfología celular, expresión de genes hepato-específicos y producción de metabolitos hepáticos.

La médula ósea fue obtenida por medio de aspiración desde el espacio medular de fémures de fetos bovinos de aproximadamente 8 a 9 meses de gestación, provenientes de una planta faenadora. La medula ósea está compuesta por un grupo celular heterogéneo en el que podemos encontrar células madre hematopoyéticas y CMM (Tropel *et al.*, 2003). Las CMM fueron aisladas desde la medula ósea en base a su capacidad de adherencia al plástico, propiedad que no poseen las células hematopoyéticas y que permite eliminarlas del medio de cultivo. La morfología de las CMM adherentes al plástico coincidió con la morfología fibroblastoide descrita para CMM aisladas desde ratones y humanos (Fridenstein *et al.*, 1976; Chivu *et al.*, 2009).

El protocolo de diferenciación hepatogénica utilizado en el presente estudio fue reportado previamente en CMM humanas aisladas desde tejido adiposo (Seo *et al.*, 2005). Durante el proceso de diferenciación hepatogénica fue posible detectar diferencias morfológicas desde el día 7 de cultivo, donde se observó una mayor proporción de células con morfología triangular en relación a la tradicional forma fibroblástica descrita para CMM indiferenciadas. Este cambio se hizo más evidente a medida que progresó el proceso de diferenciación, observándose el día 28 de cultivo una morfología celular piramidal y menos elongada que contrasta al compararlas con el tratamiento control cuya morfología fue fibroblástica. Similares cambios morfológicos han sido descritos durante el proceso de diferenciación hepatogénica en CMM humanas (Seo *et al.*, 2005; Kosmacheva *et al.*, 2011). Además de los cambios morfológicos individuales, se pudo apreciar un proceso de agregación celular en el tratamiento diferenciación a partir del día 21 de cultivo, caracterizado por la formación de conglomerados celulares que adquieren una forma tridimensional macroscópica hacia el día 28. Estos cambios morfológicos sugieren que la exposición a factores de diferenciación indujo la transformación de la morfología celular hacia una organización más compleja alejándose de la morfología y distribución típica de las CMM

indiferenciadas. Sin embargo, se debe mencionar que la forma celular observada tras 28 días de cultivo bajo condiciones de diferenciación hepatogénica difiere de la tradicional forma cúbica descrita para hepatocitos. Similares hallazgos han sido reportados en CMM humanas obtenidas desde médula ósea y cordón umbilical (Seo et al., 2005; Kosmacheva *et al.*, 2011). La falta de una morfología hepatocítica característica podría deberse a las condiciones de cultivo *in vitro* utilizadas que incluyen adherencia a la placa de plástico, cultivo en monocapa bidimensional y falta de un andamiaje o matriz extracelular, condiciones que pueden alterar la morfología celular característica. .

En humanos se describe que la expresión de ALB ocurre tempranamente en la embriogénesis hepática manteniéndose durante la vida fetal y adulta (Lee *et al.*, 2004). El análisis de la expresión de ALB a través de Q-PCR detecto un aumento progresivo en la expresión relativa de este gen a medida que aumento el tiempo de exposición a los factores inductores de diferenciación. Además hay que destacar que la expresión de este gen no fue exclusiva de CMM diferenciadas ya que las CMM indiferenciadas y controles también expresaron ALB aunque en niveles significativamente menores. Similares resultados han sido reportados previamente en estudios realizados en CMM extraídas desde médula ósea de humanos, en los cuales se describe un aumento paulatino en la expresión relativa de este gen tanto en el tratamiento control como diferenciación aunque alcanzando mayores valores en este último tratamiento (Lee et al., 2004). Sin embargo, los niveles de expresión de estos genes durante la diferenciación hepatogénica varían dependiendo del tiempo de cultivo. Estudios previos han reportado períodos de cultivo necesarios para lograr la diferenciación de CMM hacia el linaje hepatogénico que varían entre 21 a 40 días (Lee et al., 2004; Seo *et al.*, 2005; Banas *et al.*, 2007; Ayatollahi *et al.*, 2012).

La α -FP es una proteína que comienza a sintetizarse temprano en el hígado y saco vitelino durante el desarrollo embrionario y los estadios fetales, desapareciendo en la vida adulta (Cascio y Zaret, 1991). Al analizar la expresión relativa del gen de α -FP a través del uso de Q-PCR, fue posible detectar su expresión desde el día 21 de cultivo tanto en CMM diferenciadas como controles sin encontrar diferencias entre tratamientos para este día. La expresión tardía de este gen es similar a lo descrito para CMM humanas donde se reportó su expresión a partir del día 14 de cultivo en células sometidas a diferenciación hepatogénica. Sin embargo, estos autores no

detectaron expresión de este gen en el grupo control (Lee *et al.*, 2004; Banas *et al.*, 2007). Esta diferencia podría deberse al desarrollo de cierto grado de diferenciación espontánea en las CMM controles. También fue posible observar un aumento progresivo en la expresión relativa de este gen en relación al tiempo de cultivo, en forma similar a lo observado en el caso de la ALB, alcanzando su nivel más alto el día 28 de cultivo. En este estudio no se evaluó la expresión de este gen posterior al día 28 de cultivo, sin embargo en estudios previos se ha descrito una disminución de la expresión relativa de este gen en cultivos prolongados de hasta 70 días (Banas *et al.*, 2007).

La expresión de α -FP también fue analizada en CMM a través inmunofluorescencia indirecta el día 28 de cultivo. Se detectó fluorescencia específica asociada a esta proteína solo en cultivos de CMM diferenciadas, donde fue posible observar una señal de gran intensidad asociada a agregados celulares.. En comparación con estos resultados, no se observó fluorescencia específica en CMM controles o en CMM incubadas en ausencia del anticuerpo primario y/o secundario. Otros estudios reportan que es posible detectar esta proteína a partir del día 21 en cultivos celulares de CMM humanas obtenidas desde médula ósea expuestas a factores de diferenciación hepato-específicos. Sin embargo, estos reportes no hacen mención al patrón de distribución de la fluorescencia (Ayatollahi *et al.*, 2012). La expresión diferencial de esta proteína en cultivos de CMM controles y diferenciadas concuerda con los resultados obtenidos en este estudio mediante Q-PCR para la expresión del gen α -FP.

Con el objetivo de determinar el grado de multipotencia en los cultivos de CMM tras 28 días de cultivo bajo condiciones de diferenciación, se analizó la expresión relativa del gen NANOG mediante Q-PCR. El uso de esta técnica detecto mayores niveles de NANOG en CMM controles comparados con CMM sometidas a cultivo de diferenciación. Esta diferencia es coincidente con resultados obtenidos en estudios realizados en CM embrionarias humanas, donde se le otorga a este gen un rol de mantención de la pluripotencia (Go *et al.*, 2007; Wu y Tzanakakis, 2013). En consecuencia, los menores niveles en la expresión relativa de NANOG obtenidos en CMM diferenciadas estarían relacionados con la adquisición de características celulares hepatogénicas a medida que aumento el grado de diferenciación. Sin embargo, un estudio realizado recientemente en CMM bovinas obtenidas desde médula ósea fetal sugiere que la expresión relativa del gen NANOG puede variar

significativamente dependiendo de las condiciones de cultivo (Cortés *et al.*, 2013). En consecuencia el rol de NANOG en CMM no está totalmente dilucidado y se requiere de una mayor cantidad de estudios con el fin de lograr un mayor entendimiento sobre los factores que influyen en su expresión.

La caracterización del proceso de diferenciación hepatogénica en CMM también fue analizada a través de la funcionalidad celular. Dentro del normal funcionamiento de los hepatocitos se describe la capacidad de producir ciertos metabolitos, los cuales pueden ser monitoreados con el objetivo de evaluar el proceso de diferenciación. Para este efecto se cuantifico la producción de Albúmina, el almacenamiento de Glicógeno y la producción de Urea en cultivos de CMM durante el proceso de diferenciación. La cuantificación de la Albúmina secretada al medio de cultivo se realizó a través del método de verde de bromocresol. Con este método fue posible detectar la presencia de Albúmina desde el día 0 de cultivo y observar su aumento progresivo en el tiempo en ambos tratamientos. Además, este método permitió detectar una mayor producción de Albúmina en CMM diferenciadas con respecto al control. Estos resultados coinciden con lo descrito por algunos autores que también reportaron la secreción de Albúmina en forma temprana tanto en CMM humanas diferenciadas como controles, reportando niveles cercanos a los valores basales para el grupo control (Lee *et al.*, 2004; Banas *et al.*, 2007; Ayatollahi *et al.*, 2012). La detección de Albúmina en el grupo control así como en el día 0 puede explicarse por cierto grado de diferenciación espontánea al someter estas células a cultivo bajo condiciones *in vitro*. Además se puede deducir de lo observado que a medida que aumenta el tiempo de exposición de las CMM a los factores inductores de diferenciación se detecta un aumento en su capacidad de producción de Albúmina.

Para analizar el almacenamiento de glicógeno intracelular se utilizó la tinción PAS. Esta tinción tuvo una fuerte reacción representada en un intenso color violeta en las CMM tratadas con el protocolo de diferenciación. Estos resultados son coincidentes con lo que se señala en la literatura donde se menciona que CMM humanas sometidas a diferenciación hepatogénica serían capaces de almacenar glicógeno entre el día 21 y 28 de cultivo (Lee *et al.*, 2004; Ayatollahi *et al.*, 2012).

La síntesis de Urea fue estimada a través de la técnica de la Urea cinética. Mediante esta técnica fue posible observar una diferencia significativa entre los valores obtenidos por las CMM del tratamiento diferenciación respecto del control para los

días 21 y 28 de cultivo. Estos resultados reflejan que las CMM cultivadas bajo condiciones de diferenciación fueron capaces de exhibir un mayor desarrollo de esta capacidad funcional específica del hepatocito. Estudios realizados en CMM humanas adultas obtenidas desde médula ósea y tejido adiposo sometidas a diferenciación hepatogénica detectaron un aumento progresivo de la síntesis de Urea en el tiempo pero no describen el desarrollo de esta capacidad por parte del grupo control (Banas *et al.*, 2007; Ayatollahi *et al.*, 2012).

Para que una CMM indiferenciada adquiera una capacidad funcional hepatogénica es necesario el desarrollo de una maquinaria metabólica, síntesis de enzimas y proteínas propias de un hepatocito funcional. Esto se produce como consecuencia de la expresión de genes específicos de este linaje celular cuya regulación depende de la presencia de factores de diferenciación presentes en el medio junto con condiciones de cultivo específicas (Kim *et al.*, 2004). Basándose en los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar que es posible aislar CMM bovinas desde médula ósea fetal e inducir su diferenciación hacia el linaje hepatogénico bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Tradicionalmente se ha reportado la capacidad de las CMM de diferenciarse hacia linajes mesodérmicos. En consecuencia, el potencial de diferenciación de CMM hacia un tipo celular con características similares a un hepatocito, perteneciente a un linaje celular endodérmico es de trascendencia y demuestra la gran plasticidad de estas células. Adicionalmente, este tipo de evidencia abre la posibilidad de utilización de estas células eventualmente para medicina regenerativa en el caso de daño hepático. El modelo bovino constituye un nicho de información pobremente explorado en la investigación en CMM. Este estudio sugiere que este modelo tiene ventajas comparativas en cuanto a la disponibilidad de tejidos y a su similitud en la fisiología con el modelo humano, pudiendo generar una importante fuente de conocimiento sobre la biología de estas células.

5 Agradecimientos

Esta investigación fue financiada a través del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT (proyecto N° 11100205).

Se agradece a la Faenadora y Frigorífico Cordillera S.A., al Centro Biotecnológico Veterinario (Biovetec) FAVET-Universidad de Chile, al Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Biomateriales (CIMAT) FAVET-Universidad de Chile, al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva FAVET-Universidad de Chile y al Laboratorio de Mecanismos de la Infección Parasitaria (LMIP), Facultad de Medicina Universidad de Chile por su cooperación en este estudio.

No podría dejar de agradecer a mis padres, hermanos, tíos, primos y amigos, sin ellos este largo camino se hubiese hecho aún más difícil, gracias por su apoyo incondicional. Gracias al Doctor Oscar Peralta por su buena disposición, paciencia y conocimiento. Por último agradecer a mis compañeros de café y a esta altura amigos de laboratorios Yenny, Fernando, Diego, Paulina, Christian, Sonia y Cynthia, gracias por toda su ayuda.

6 Bibliografía

- **AYATOLLAHI, M.; KABIR SALMANI, M.; SOLEIMANI, M.; ZIAADIN TABELI, S.** 2012. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. *World J Stem Cells* 54:113-121.
- **BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F.; QUINN, G.; OKOCHI, H.; OCHIYA, T.** 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 35:219-228.
- **BIANCO, P.; ROBEY, P.; SIMMONS, P.** 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting, history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 10:313-319.
- **BIRCHMEIER, C.; BLADT, F.; BRINKMANN, V.; GHERARDI, E.; GOEDECKE, S.; SCHMIDT, C.; SHARPE, M.; ZSCHIESCHE, W.** 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373:699-702.
- **BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T.** 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319(2):243-253.
- **CASCIO, S.; ZARET, KS.** 1991. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development* 113:217-225.
- **CHRISTOLOUDOU, I.; KOLISIS, FN.; PAPAEVANGELIOU, D.; ZOUMPOURLIS, V.** 2013. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal and adult origin during prolonged in vitro expansion: Considerations for cytotherapy. *Stem Cells Int* 70:150-162.

- **CHIVU, M.; DIMA, SO.; STANCU, CI.; DOBREA, C.; USCATESCU, V.; NECULA, LG.** 2009. *In vitro* hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl Res* 154:122-132.

- **CORTES, Y.; OJEDA, M.; ARAYA, D.; DUEÑAS, F.; FERNANDEZ, MS.; PERALTA, O.** 2013. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Veterinary Research* 9:133.

- **DIETER, H.; EURELL, J.** 1998. *Textbook of veterinary histology* 5ta edición, editorial Williams y Wilkins. 194-199.

- **DONG, X.; PAN, R.; SHAO, J.; XIANG, L.; ZHANG, H.** 2010. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World J Gastroenterol* 65:3267-3278.

- **FORTE, G.; MINIERI, M.; COSSA, P.; ANTENUCCI, D.; SALA, M.; GNOCCHI, V.; FIACCAVENTO, R.; CAROTENUTO, F.; DE VITO, P.** 2006. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration and differentiation. *Stem Cells* 24:23-33.

- **FRIEDENSTEIN, A.; GORSKAJA, J.; KULAGINA, N.** 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 4:267-274.

- **GHAEDI, M.; TULEUOVA, N.; ZERN, M.; WU, J.; REVZIN, A.** 2011. Bottom-up signaling from HGF-Containing surfaces promotes hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407:295-300.

- **GO, M.; TAKENAKA, C.; OHGUSHI, H.** 2007. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res* 314(5):1147-1154.

- **KIM, B.; LEE, RH.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, HS.; SUH, K.; BAE, YC.; JUNG, JS.** 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14:311-324.

- **KOSMACHEVA, SM.; SEVIARYM, IN.; GONCHAROVA, NV.; PETYOYKA, NV.; POTAPNEV, MP.** 2011. Hepatogenic potential of human bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med* 151:142-149.

- **LEE, K.; KUO, T.; WHANG-PENG, J.; CHUNG, Y.; LIN, C.; CHOU, S.; CHEN, J.; CHEN, Y.; LEE, OK.** 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40:1275-1284.

- **LEI, H.; YU, B.; HUANG, Z.; YANG, X.; LIU, Z.; MAO, X.; TIAN, G.; HE, J.; HAN, G.; CHEN, H.; MAO, Q.; CHEN, D.** 2013. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from adult mouse adipose, muscle, and fetal muscle. *Mol Biol Rep* 40:185-192.

- **LINDROOS, PM.; MICHPOULOS, GK., ZARNEGAR, R.** 1991. Hepatocyte growth factor rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbón chlotide administration. *Hepatology* 13:743-750.

- **MIYAJIMA, A.; KINOSHITA, T.; TANAKA, M.; KAMIYA, A.; MUKOUYAMA, Y.; HARA, T.** 2000. Role of oncostatina M in hepatopoiesis and liver development. *Citokine Growth Factor Rev* 11:177-183.

- **PIERANTOZZI, E.; GAVA, B.; MANINI, I.; ROVIELLO, F.; MAROTTA, G.; CHIAVARELLI, M.; SORRENTINO, V.** 2011. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but no of OCT--4 and SOX-2. *Stem Cells and development* 20(5):915-923.

- **PITTINGER, M; MACKAY, A; BECK, S.; JAISWAL, R.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.; MOORMAN, M.; SIMONETTI, D.; CRAIG, S.; MARSHAK D.** 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147.

- **PULAVENDRAN, S.; ROSE, C.; BARAN, A.** 2011. Hepatocyte growth factor incorporated chitosan nanoparticles augment the differentiation of stem cell into hepatocytes for the recovery of liver cirrhosis in mice. *J Nanobiotechnology* 19:1-11.

- **ROMANOV, YA.; SVINTSITSKAYA, VA.; SMIRNOV, VN.** 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cor. *Stem Cells* 21:105-110.

- **SCHWARTZ, R.; REYES, M.; KOODIE, L.; JIANG, Y.; BLACKSTAD, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; JOHNSON, S.; HU, W.; VERFAILLIE, C.** 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clint invest* 109:1291-1302.

- **SEO, MJ.; SUH, SY.; JUNG, JS.** 2005. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328:258-264.

- **SHIOJIRI, N.** 1981. Enzymo and imunocytochemical analyses of the differentiation of liver cells in prenatal mouse. *J Embryol Exp Morphol* 19:139-152.

- **SKARPEN, E.; OKSVOLD, M.; GROSVIK, H.; WIDNES, C.; HUITFELDS, H.** 2005. Altered regulation of EGF receptor signaling following a partial hepatectomy. *J Cell Physiol* 202:707- 716.

- **SNYKERS, S.; VANHAECKE, T.; PAPELEU, P.; LUTTUN, A.; JIANG, Y.; VANDER-HEYDEN, Y.; VERFAILLIE, C.; ROGIERS, V.** 2006. Sequential exposure to cytokine reflecting embryogenesis: the key for *in vitro* differentiation of adult bone marrow stem cell into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci* 94:330-341.

- **TOKCAER-KESKIN, Z.; AKAR, AR.; AYALOGLU-BUTUN, F.; TERZIOGLU-KARA, E.; DURDU, S.; OZYURDA, U.; UGUR, M. AKCALI, KC.** 2009. Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for *in vitro* cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Can J Physiol Pharmacol* 87:143-150.

- **TROPEL, P.; NOEL, D.; PLATET, N.; LEGRAND, P.; BENABID, A.; BERGERA, F.;** 2003. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research* 295:395-406.

- **VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, LF.; GORNI, CH.; 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.

- **WU, XB.; TAO, R.** 2012. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 11:360-370.

- **WU, J.; TZANAKAKIS, ES.** 2013. Distinct allelic patterns of nanog expression impart embryonic stem cell population heterogeneity. *PLoS Comput Biol* 9:136-147.

- **YAMAMOTO, Y.; BANAS, A.; MURATA, S.; ISHIKAWA, M.; LIM, C.; TERATANI, T.; HATADA, I.; MATSUBARA, K.; KATO, T.; OCHIYA, T.** 2008. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic

differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. FEBS J 275:1260-1273.

- **YOUNG, H.; BLACK, H.** 2004. Adult stem cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 276(1):75-102.
- **ZHAO, W.; LI, J.; CAO, D.; LI, X.; ZHANG, L.; HE, Y.; YUE, S.; WANG, D.; DOU, K.** 2012. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. World J Gastroenterol 18:1048-1058.