



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

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO Y
ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN
OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (CMM)
BOVINAS**

Yennifer Alejandra Cortés Araya

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

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO Y
ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN
OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (CMM)
BOVINAS**

Yennifer Alejandra Cortés Araya

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

NOTA FINAL:

		NOTA:	FIRMA:
PROFESOR GUÍA:	ÓSCAR PERALTA T.
PROFESOR CONSEJERO:	MÓNICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO:	M. SOLEDAD FERNANDEZ G.

FONDECYT N 11100205

SANTIAGO, CHILE
2013

Memoria de Título

“Efecto de la suplementación de Suero Fetal Bovino y Ácido Ascórbico sobre la diferenciación osteogénica de Células Madre Mesenquimales (CMM) bovinas”

“Supplementation of fetal bovine serum and ascorbic acid on the osteogenic differentiation of bovine mesenchymal stem cells (MSC)”

Yennifer A. Cortés A¹, Lic. Med Vet., Universidad de Chile.

¹ Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. yennifercortes@u.uchile.cl

Financiamiento Proyecto Fondecyt N 11100205

Abstract

The main objective of the present study was to determine the effect of different concentrations of Fetal Bovine Serum (FBS) and Ascorbic Acid (AA) on the osteogenic differentiation of bovine Mesenchymal Stem Cells (MSC). MSC were isolated from bovine fetuses bone marrow, based on the capacity to adhere to plastic culture flasks and subsequently cultured in different treatments. The DMEM medium was supplemented with dexamethasone (100 nM), β -glycerophosphate (10 mM), 0 mM AA - 0% FBS (T1); 0.1 mM AA - 10% FBS (T2); 0.01 mM AA - 10% FBS (T3); 0.001 mM AA - 10% FBS (T4); 0.1 mM AA - 5% FBS (T5); 0.1 mM AA - 2% FBS (T6). Osteogenic differentiation was analyzed by quantification of osteo-specific gene osteocalcin (*OCN*), pluripotency gene (*NANOG*) and endogenous gene glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA expression using quantitative PCR. Alkaline phosphatase activity (ALPL) was quantified using spectrophotometry. Mineral deposits were detected using Von Kossa staining. MSC in T2 treatment expressed higher ($P < 0.05$) *OCN* mRNA levels (33.7-fold the expression in T1) compared to the other treatments. *NANOG* mRNA levels decreased ($P < 0.05$) in all treatments supplemented with AA and FBS. ALPL activity increased in MSC treated with AA and FBS, except in T4. A strong signal for Von Kossa staining was observed in T2 MSC cultures. In conclusion, supplementation of a high concentration of AA in the osteogenic medium induced a higher differentiation of bovine MSC into the osteogenic lineage. Supplementation of FBS partially contributed with the osteogenic differentiation by increasing the extracellular matrix production and mineral deposition.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Bovine fetuses, Osteogenic lineage, Osteocalcin.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de distintas concentraciones de Suero Fetal Bovino (SFB) y Ácido Ascórbico (AA) sobre la diferenciación osteogénica de Células Madre Mesenquimales (CMM) bovinas. Las CMM fueron aisladas desde médula ósea de fetos bovinos, mediante adherencia al plástico y posteriormente cultivadas en los distintos tratamientos. El medio DMEM fue suplementado con dexametasona (100 nM), β -glicerofosfato (10 mM), más concentraciones variables de AA y SFB; 0 mM AA - 0% SFB (T1); 0,1 mM AA - 10% SFB (T2); 0,01 mM AA - 10% SFB (T3); 0,001 mM AA - 10% SFB (T4); 0,1 mM AA - 5% SFB (T5); 0,1 mM AA - 2% SFB (T6). La diferenciación fue analizada al día 21 de cultivo mediante cuantificación de la expresión de los genes osteo-específico Osteocalcina (*OCN*), pluripotencia (*NANOG*) y del control endógeno gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) utilizando PCR cuantitativo. La actividad de Fosfatasa Alcalina (FA) fue cuantificada mediante espectrofotometría. El depósito de minerales fue evaluado mediante tinción Von Kossa. En T2 se expresaron los mayores ($P < 0,05$) niveles de ARNm de *OCN* (33,7 veces la expresión del T1). Los niveles de ARNm de *NANOG* disminuyeron ($P < 0,05$) en todos los tratamientos suplementados con AA y SFB. La actividad de FA aumentó en CMM suplementadas con SFB y AA a excepción de T4. Se observó una alta intensidad en la tinción Von Kossa en T2. En conclusión, el SFB participa parcialmente en la diferenciación osteogénica, mientras que la suplementación de una alta concentración de AA aumenta la capacidad de diferenciación de las CMM bovinas hacia el linaje osteogénico.

Palabras clave: Células madre mesenquimales, Feto bovino, Linaje osteogénico, Osteocalcina.

1 Introducción

Las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotentes, con una amplia capacidad de auto renovación, proliferación y diferenciación multilínea (Violini *et al.*, 2009). La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha propuesto los siguientes criterios para la identificación de CMM: 1) capacidad de adherencia a placas de plástico durante su cultivo; 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 (Dominici *et al.*, 2006). Bajo estos criterios, las CMM han sido identificadas y aisladas en diversos tejidos que incluyen médula ósea (Pittenger *et al.*, 1999), grasa (Fraiser *et al.*, 2006), músculo esquelético (Sakaguchi *et al.*, 2005), sangre de cordón umbilical (Bieback *et al.*, 2004), líquido amniótico, pulmón, hígado fetal (Chen *et al.*, 2008), pulpa dental y ligamento periodontal (Kolf *et al.*, 2007), entre otros. La médula ósea es la fuente de CMM más estudiada en la actualidad ya que se destaca por contener CMM con un alto potencial de diferenciación y proliferación en cultivos *in vitro*, en comparación con las CMM aisladas desde otros tejidos (Chen *et al.*, 2008). Junto con ello, se describe que las CMM aisladas desde médula ósea fetal poseen ventajas particulares, como una reducida respuesta inmunogénica *in vivo* (Chen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Rastegar *et al.*, 2010). Esto se debe a que las CMM modulan la respuesta inmune y son negativas al complejo mayor de histocompatibilidad (Chen *et al.*, 2008) permitiendo su potencial utilización en individuos compatibles sin necesidad de utilizar terapia inmunosupresiva (Rastegar *et al.*, 2010). La capacidad de diferenciación de las CMM hacia múltiples linajes, así como su facilidad de aislamiento y expansión *in vitro*, hacen de estas células una atractiva fuente para el desarrollo de la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos (Pittenger *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008; Violini *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

En el campo de la investigación científica el desarrollo de modelos animales es primordial ya que permite contar con un amplio material de estudio (Bosnakovski *et al.*, 2005). El modelo bovino se presenta como una alternativa atractiva debido a que es una fuente abundante y disponible de células, además de que su biomecánica y fisiología es de mayor similitud a la humana (Bosnakovski *et al.*, 2005). Sin embargo existen escasos estudios sobre la biología y el potencial de diferenciación de las CMM en la especie bovina en comparación con el modelo murino (Bosnakovski *et al.*, 2005).

Los cultivos celulares se han constituido en una herramienta valiosa de investigación y se usan ampliamente como un modelo de estudio previo a la experimentación *in vivo* (van der Valk *et al.*, 2010). La principal dificultad para el cultivo de diferentes líneas celulares es la formulación de medios de cultivo que permitan sustituir el ambiente fisiológico en el que crecen las células bajo condiciones *in vivo*. Durante las últimas décadas se han realizado un sinnúmero de estudios orientados a determinar el rol que juegan los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas en el cultivo y diferenciación *in vitro* de CMM (Mucci *et al.*, 2006; Vater *et al.*, 2011). De esta forma se busca determinar una combinación óptima de factores que permita maximizar la capacidad de mantención y diferenciación de estas células.

La diferenciación osteogénica implica el progreso de una serie de etapas, en las cuales se obtienen estadios intermedios de diferenciación osteoblástica que culminan con la formación de osteoblastos maduros y funcionales. Es posible reconstituir este modelo de osteodiferenciación bajo condiciones *in vitro*, mediante el cultivo de CMM en presencia de factores osteoinductores. Como factores osteoinductores se utilizan Dexametasona, β -Glicerofosfato, así como el mencionado Ácido Ascórbico (AA) (Vater *et al.*, 2011). La Dexametasona, estimula la proliferación de las CMM y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico (Lee *et al.*, 2003). El β -Glicerofosfato actúa como sustrato de fosfato orgánico, necesario para la formación de hidroxiapatita (Lee *et al.*, 2003). En presencia de estos suplementos, las CMM adquieren cambios morfológicos y aumentan la actividad de la enzima Fosfatasa Alcalina (FA), la cual juega un papel fundamental en la mineralización de la matriz extracelular. La FA hidroliza los ésteres de fosfato, liberando fósforo inorgánico, el que produce depósitos de cristales de hidroxiapatita, mineral indispensable para el inicio de la etapa de diferenciación (Yang *et al.*, 2003).

Previo a la osteodiferenciación, las CMM comienzan a multiplicarse, aumentando la expresión de genes asociados a la proliferación celular, como el factor de transcripción "Core-binding factor α -1" (CBFA1) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) integrantes de la familia Hedgehog (Violini *et al.*, 2009). Posterior a la proliferación celular, comienza el proceso de diferenciación caracterizado por la activación de la FA, que cataliza la eliminación de grupos fosfatos permitiendo la presencia de un pH alcalino y propiciando el crecimiento y el desarrollo óseo. Esta enzima es indispensable para la formación del hueso y el aumento de su actividad indica el inicio de la etapa de diferenciación (Yang *et al.*, 2003). La última etapa del proceso osteogénico se encuentra

caracterizada por la expresión de proteínas involucradas en la organización de la matriz extracelular, como el colágeno tipo 1 (COL1). Además durante esta etapa aumenta la expresión de proteínas que colaboran en la formación del mineral óseo, entre las que se encuentran osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina (OCN) (Ducy *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2004; Vater *et al.*, 2011). La OCN es una de las proteínas más abundantes de la matriz extracelular, su expresión está altamente restringida al tejido óseo, específicamente a las regiones destinadas a la mineralización (Owen *et al.*, 1990). Es producida únicamente por el osteoblasto durante el proceso osteogénico. Por lo tanto, es un marcador de diferenciación osteogénica ya que adquiere sus máximos niveles de expresión durante el período de mineralización (Owen *et al.*, 1990).

Varios estudios se han realizado con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares que regulan el estado indiferenciado de las células madre. Se han identificado una serie de factores de transcripción como NANOG, OCT4 y SOX2 que regulan el mantenimiento del estado pluripotente de las células madre embrionarias (Violini *et al.*, 2009; Pierantozzi *et al.*, 2011; Miyanari *et al.*, 2012). En el caso de las CMM, se ha planteado que estos factores cumplen un rol similar, sin embargo se ha detectado diferencias en cuanto a su expresión en este tipo celular. Si bien, un grupo de investigadores ha detectado la expresión de NANOG y OCT4 en CMM humanas (Pierantozzi *et al.*, 2011), estos autores han reportado que los niveles de expresión son casi inexistentes en cultivos *in vitro* y que la actividad de OCT4 es prescindible en la capacidad de autorenovación de las CMM (Pierantozzi *et al.*, 2011). También, se ha encontrado que la expresión elevada de NANOG aumenta el potencial de diferenciación hacia linaje osteogénico y la tasa de crecimiento celular (Go *et al.*, 2008). En CMM porcinas se ha descrito la participación conjunta de NANOG Y OCT4 en el aumento del potencial de diferenciación condrogénico (Liu *et al.*, 2009) y efectos contrarios en el linaje adipogénico, en donde la elevada expresión de NANOG enlentece el proceso de diferenciación, mientras que la elevada expresión de OCT4 mejora dicho proceso (Liu *et al.*, 2009). Los estudios sobre la regulación de estos genes son cruciales para la comprensión del funcionamiento celular pero los mecanismos que regulan su expresión *in vivo* aún no han sido descubiertos (Miyanari *et al.*, 2012).

El Suero Fetal Bovino (SFB) se utiliza como suplemento para medios de cultivo celulares. Se obtiene mediante el procesamiento de sangre fetal recolectada durante el proceso de faenamiento del ganado, mediante punción cardiaca o umbilical. Su composición,

incluyendo la concentración de cada uno de sus componentes no es totalmente conocida (Iturriaga, 2003). El SFB posee una mezcla compleja y contiene un gran número de factores que incluyen glucosa, proteínas, vitaminas, oligoelementos, hormonas y factores de crecimiento (van der Valk *et al.*, 2010). Muchos de estos factores son esenciales e indispensables para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de las células (Lee *et al.*, 2003). En el SFB se puede encontrar concentraciones de glucosa hasta seis veces superior respecto al suero de un bovino adulto y por lo tanto se constituye como una importante fuente energética (Mucci *et al.*, 2006). Además, se han determinado concentraciones de albúmina y globulinas superiores en un 85% en comparación al suero de un bovino adulto (Mucci *et al.*, 2006). En relación a los factores de crecimiento, se ha descrito la presencia entre otros del factor de crecimiento transformante (“transforming growth factor”; TGF) y del factor de crecimiento similar a insulina 1 (“insulin-like growth factor 1”; IGF-I) (Mucci *et al.*, 2006). Estos factores ejercen su efecto mediante la unión a receptores específicos tirosina-quinasa ubicados en la membrana celular, iniciando reacciones en cascada que culminan con la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión génica (Mucci *et al.*, 2006). En este sentido se señala que la alta concentración de factores como TGF y IGF1 reduce la incidencia de apoptosis y aumenta la división celular en los cultivos (Mucci *et al.*, 2006). Además, estimulan la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Lindroos *et al.*, 2010), lo que influye de manera directa en la formación de depósitos de minerales en cultivos osteogénicos. Estudios recientes señalan que los factores de crecimiento presentes en el SFB podrían promover la proliferación y diferenciación temprana de osteoblastos *in vitro* (Lindroos *et al.*, 2010).

El uso de SFB en cultivos celulares es controvertido, en primera instancia por la amplia variación existente en su composición, la cual depende del estado sanitario e inmunitario de los individuos desde los cuales es obtenido (van der Valk *et al.*, 2010). Esta variación podría introducir cantidades variables de componentes, ocasionando efectos variables y difícilmente cuantificables sobre el desarrollo y la diferenciación celular. Por otra parte, existe la posibilidad de contaminación biológica procedente del feto o de la línea de producción. En este sentido, se describen casos de SFB comerciales contaminados con virus de la diarrea viral bovina (VDVB), lo cual supone un riesgo particularmente importante para la fabricación de productos biológicos de uso veterinario y humano (Iturriaga, 2003). A pesar de estos riesgos, el SFB se usa rutinariamente como aporte de

factores de crecimiento en cultivos celulares, generando un efecto positivo tanto en la proliferación como en la sobrevivencia de las células (Lee *et al.*, 2003; Iturriaga, 2003; Mucci *et al.*, 2006).

El Ácido Ascórbico (AA) es un factor inductor ampliamente utilizado para la diferenciación de células madre hacia la línea osteogénica (Owen *et al.*, 1990; Xiao *et al.*, 1997). El AA utiliza un sistema de transporte dependiente de sodio, por lo tanto la presencia de este ión es esencial para su utilización (Xiao *et al.*, 1997). La actividad del AA estimula la hidroxilación de aminoácidos y el procesamiento de procolágeno en el espacio intracelular. La síntesis de colágeno depende de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina que ocurren en el retículo endoplasmático de la célula (Xiao *et al.*, 1997). Las enzimas hidroxilasas que catalizan esta reacción necesitan la presencia de AA, el cual actúa como cofactor enzimático para modificar la estructura de los aminoácidos y así lograr la formación de la triple hélice de fibras de colágeno que permiten mantener la estructura del tejido óseo (Xiao *et al.*, 1997). La concentración de AA durante el cultivo puede modular la proliferación y la diferenciación de las CMM (Choi *et al.*, 2008). Pese a su rol en la inducción de diferenciación osteogénica, aún no se ha determinado como el AA afecta la expresión de marcadores de diferenciación. Lo anterior, motiva a realizar nuevos estudios para determinar el efecto de este factor sobre la diferenciación osteogénica en CMM bovinas.

Considerando los antecedentes anteriores, la hipótesis para el presente trabajo es que la suplementación de concentraciones variables de SFB y AA en los medios de cultivo ejerce un efecto dosis dependiente sobre la diferenciación osteogénica de CMM bovinas. Lo que se traduciría en un efecto sobre mayores o menores niveles de diferenciación celular. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue el de determinar el efecto de la suplementación de distintas concentraciones de SFB y AA sobre la diferenciación osteogénica *in vitro* de CMM bovinas.

2 Material y métodos

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Células Madre (Proyecto Fondecyt N 11100205) del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET-UCH), con la cooperación del Centro Biotecnológico Veterinario (Biovotec) FAVET-UCH y del Centro

para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencia de los Materiales (CIMAT) FAVET-UCH. Este estudio contó con la aprobación del Comité de Bioética del Fondo Nacional del Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

2.1 Aislamiento de CMM desde médula ósea bovina

Las médulas óseas se obtuvieron desde fémures de fetos bovinos de 8 a 9 meses de gestación (n=3) provenientes de una planta faenadora. Las muestras de médula ósea fueron aspiradas mediante una bránula de 18 G conectada a una jeringa de 10 ml conteniendo 2 ml de medio de colección Dulbecco's Modified Eagle Medium alto en glucosa (DMEM; Gibco, Grand Islands, EUA); suplementado con 1000 UI/ml de heparina y 100 µg/ml de Estreptomicina/ 100 UI/ml de Penicilina. El aspirado se centrifugó dos veces en una solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Hyclone Laboratories, Logan, EUA) y dos veces en medio de colección sin heparina a 300 G por 5 minutos. El sedimento fue aspirado y suspendido en medio de expansión el cual consistió en DMEM alto en glucosa (4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado con 10% de SFB (Hyclone Laboratories), 100 µg/ml de Estreptomicina y 100 UI/ml de Penicilina en una placa Petri e incubado a 38°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de dos días de cultivo, las células no adheridas al plástico se removieron mediante lavado con PBS y cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia celular, se realizaron pasajes mediante remoción con 0,25% de tripsina/EDTA por 5 min. Las CMM se cultivaron en medio de expansión hasta que se obtuvo suficiente número de células para los experimentos de diferenciación osteogénica.

2.2 Diferenciación osteogénica

El medio de diferenciación consistió en DMEM alto en glucosa, suplementado con 100 nM de Dexametasona, 10 mM de β-Glicerofosfato, 100 UI/ml Penicilina/100 µg/ml Estreptomicina y 2,5 µg/ml Anfotericina. Para determinar el efecto del SFB y AA se adicionó concentraciones variables de estos factores como se indica en la Tabla 1. Se definió un control negativo (T1), el cual no fue suplementado con AA o SFB y un control positivo (T2), el cual contenía las concentraciones de SFB y AA descritas previamente (Pittenger *et al.*, 1999; Bosnakovski *et al.*, 2005). Las CMM se cultivaron por 21 días a 38°C con 5% de CO₂, bajo un ambiente controlado. Se realizó cambio de medio de cultivo cada 48 horas y las muestras se obtuvieron al día 21 de cultivo para análisis.

Tabla 1: Concentraciones de SFB y AA suplementadas en los distintos tratamientos de cultivo de CMM bovinas.

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	T6
AA (mM)	0	0,1	0,01	0,001	0,1	0,1
SFB (%)	0	10	10	10	5	2

2.3 PCR-Cuantitativo

Al día 21 de cultivo se obtuvieron muestras de células desde los distintos tratamientos, las cuales fueron fijadas en solución tampón RLT (Qiagen Inc, Valencia, EUA) con 1% β -mercaptoetanol y conservadas a -18°C . La diferenciación osteogénica se determinó midiendo los niveles de ARNm del marcador osteogénico *OCN*, del marcador de pluripotencia *NANOG* y del control endógeno *GAPDH* mediante PCR cuantitativo (Q-PCR). El ARN total se aisló utilizando un mini “kit” RNAeasy (Qiagen) y se cuantificó mediante espectrofotometría. El cDNA se sintetizó y amplificó mediante un “kit” Brilliant II SYBR Green RT-PCR (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) utilizando un termociclador. Para la reacción de PCR se utilizó un “kit” Brilliant SYBR Green Q-PCR Master mix (Stratagene, La Joya, CA). Cada tubo de reacción contenía 12,5 μl de Master mix, 2,5 μl de partidor forward, 2,5 μl de partidor reverse, 0,375 μl de tinción de referencia Rox, 2 μl de cDNA y H_2O hasta alcanzar un volumen total de 25 μl . La reacción se cuantificó en un termociclador Step One (Applied Biosystems, Foster City, EUA). La expresión de *OCN*, *NANOG* y *GAPDH* se calculó mediante el método de $\Delta\Delta\text{CT}$.

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de partidores utilizados en Q-PCR.

Gen	Secuencias nucleotídicas (5'- 3')	
<i>OCN</i>	Forward	TGACAGACACACCATGAGAACCC
	Reverse	AGCTCTAGACTGGGCCGTAGAAG
<i>NANOG</i>	Forward	GTGTTTGGTGA ACTCTCCTG
	Reverse	GGGAATTGAAATACTTGACAG
<i>GAPDH</i>	Forward	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA
	Reverse	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG

2.4 Fosfatasa Alcalina

La actividad de la enzima FA se detectó al día 21 de diferenciación utilizando el “kit” Calbiochem (EMD Biosciences, La Joya, EUA). Para cada repetición (n=3) se analizó la actividad de FA en cada tratamiento (Tabla 1), en un control negativo (Tritón) y en un control positivo (FA). Las células se sometieron a permeabilización mediante adición de 0,2% de Tritón X-100 (Sigma, Saint Louis, EUA) por 20 minutos a 38 °C. Cada tubo de reacción contenía 50 µl de solución de lisis celular (células permeabilizadas en Tritón al 0,2%), 100 µl de solución de sustrato de FA (p- NPP; 40 µl de p – NPP concentrado, 1560 µl de H₂O desionizada y 400 µl de solución tampón p- NPP). Las mediciones se hicieron al minuto 30 de reacción con una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro (Bio Rad, Hercules, EUA).

2.5 Tinción de Von Kossa

La presencia de depósitos de minerales en las CMM diferenciadas se determinó al día 21 de cultivo mediante tinción de Von Kossa. Se detectó el depósito de minerales en cada tratamiento (Tabla 1). Las células se sometieron a una fijación con Paraformaldehído al 4% y posteriormente se conservaron a 4°C hasta su análisis. La tinción se realizó posterior a un lavado con agua destilada (H₂O), incubando las células durante 10 minutos en una solución al 2% de nitrato de plata (AgNO₃) en oscuridad. Posteriormente las CMM se sometieron a la luz directa por 15 minutos y se registraron mediante microscopio de campo claro conectado a una cámara de fotomicroscopía (Olympus, Tokyo, Japón).

2.6 Inmunodetección de Osteocalcina

La expresión de la proteína OCN se inmunodetectó mediante inmunofluorescencia. Las células de cada tratamiento al día 21 de diferenciación se sometieron a una fijación con Paraformaldehído al 4% y posteriormente se permeabilizaron utilizando 1% de Tritón X-100 por 20 minutos y luego se lavaron con PBS por 5 minutos. Las células se sometieron a un bloqueo con suero de burro (Sigma) al 10% por 20 minutos. La incubación con anticuerpo primario de ratón anti OCN diluido en suero de burro (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) se realizó durante toda la noche a 4°C. Previo a la incubación con el anticuerpo secundario las placas se lavaron con PBS por 5 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario IgG anti ratón asociado a FITC diluido en suero de burro 1% (1:100) se realizó durante 45 minutos. Finalmente las células se tiñeron con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI; Santa Cruz Biotechnology) y se montaron en cubreobjetos para su posterior registro mediante un microscopio de epifluorescencia asociado a una cámara de fotomicroscopía E400 (Olympus, Tokyo, Japón).

2.7 Análisis de datos

Los datos de tres replicas experimentales se evaluaron utilizando el “software” Info Stat (Córdoba, Argentina, 2008). Los promedios de expresión génica y de actividad de la FA fueron analizados por medio de la prueba de normalidad Shapiro Wilks y convertidos a logaritmo en base 10. Posteriormente fueron analizados por medio de ANDEVA de una vía. La diferencia entre promedios para cada tratamiento fue comparada por medio del test de Duncan utilizando un valor de significancia $P < 0,05$.

3 Resultados

Las CMM se aislaron desde médula ósea en base a su capacidad de adherencia al plástico y posteriormente se cultivaron en mono capa hasta alcanzar una confluencia de 80 a 90%. Para evaluar el efecto de los tratamientos en la morfología celular se tomó una serie de microfotografías que permitieron determinar el cambio morfológico asociado al proceso de diferenciación osteogénico (Figura 1). Estos cambios se caracterizaron por la adquisición de una marcada complejidad de la morfología celular, conjuntamente con la formación de matriz extracelular. En todos los tratamientos se observó una variación de la morfología inicial; sin embargo, con el paso de los días fue evidente una marcada

disminución en el número de células tanto en el T1 como en T6. Además, en T1 se observaron células con menor tamaño, menor complejidad y no se evidenció de manera clara la formación de matriz extracelular. En los cultivos de CMM tratadas con concentraciones decrecientes de AA (T3 y T4) se observaron células con una morfología más simple y a su vez una disminuida formación de matriz extracelular. En las CMM de T2 se observaron mayores cambios, con una morfología fibroblástica característica que fue cambiando hacia una morfología cúbica con un aumento en cantidad de proyecciones celulares. Mediante las microfotografías comparativas (Figura 1) se evidenció una marcada diferencia entre T1 y T2, caracterizada por una menor confluencia celular y baja formación de proyecciones en las células sin suplementación (T1), versus la evidente complejidad celular y la elevada confluencia de T2. Adicionalmente, en todos los tratamientos suplementados con AA y SFB se observó una variación de la morfología inicial.

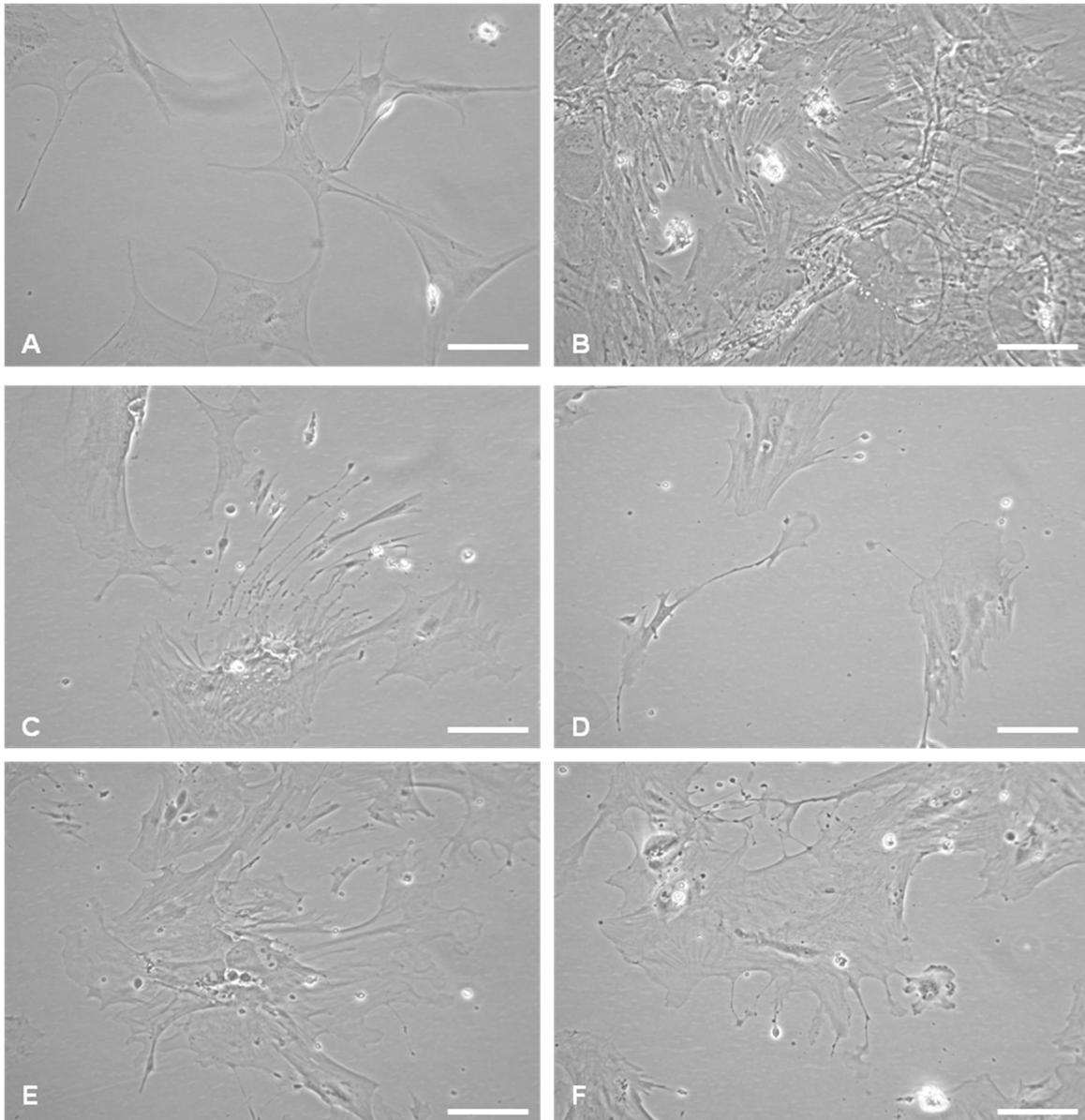


Figura 1 Microfotografías de CMM bovinas luego de 21 días de cultivo bajo distintos tratamientos de diferenciación osteogénica. Los distintos tratamientos contenían concentraciones variables de AA y SFB y correspondieron a: T1 (A), T2 (B), T3 (C), T4 (D), T5 (E) y T6 (F). Se observó un mayor número de células y una elevada complejidad celular en T2 (0,1mM AA - 10%SFB) en comparación con las células sin suplementación (T1). En los otros tratamientos se evidencia una disminución en el número de células y una disminución en las proyecciones celulares. Barra de escala = 200 μ m.

El análisis de la diferenciación osteogénica se realizó mediante la determinación del nivel de expresión relativa del gen osteo-específico *OCN* por medio de Q-PCR. La suplementación de 0,1 mM de AA y 10% de SFB (T2) indujo los mayores ($P < 0,05$) niveles de ARNm de *OCN* al día 21 de cultivo (33,7 veces en relación a la expresión del T1). Los menores niveles de ARNm de *OCN* se obtuvieron en las CMM sin suplementación de AA

o SFB (T1) y en la suplementación más baja de AA (T4; 2 veces en relación a la expresión del T1; $P < 0,05$).

Como marcador asociado a pluripotencia se evaluó la expresión de *NANOG* mediante Q-PCR. Los resultados obtenidos muestran que la suplementación de AA o SFB disminuyeron ($P < 0,05$) los niveles de ARNm de *NANOG*. En T2 la expresión de ARNm de *NANOG* fue de 0,04 veces en relación a la expresión del T1. En T4 y en T6 la disminución en la expresión de ARNm de *NANOG* fue de 0,03 veces menos en relación a T1.

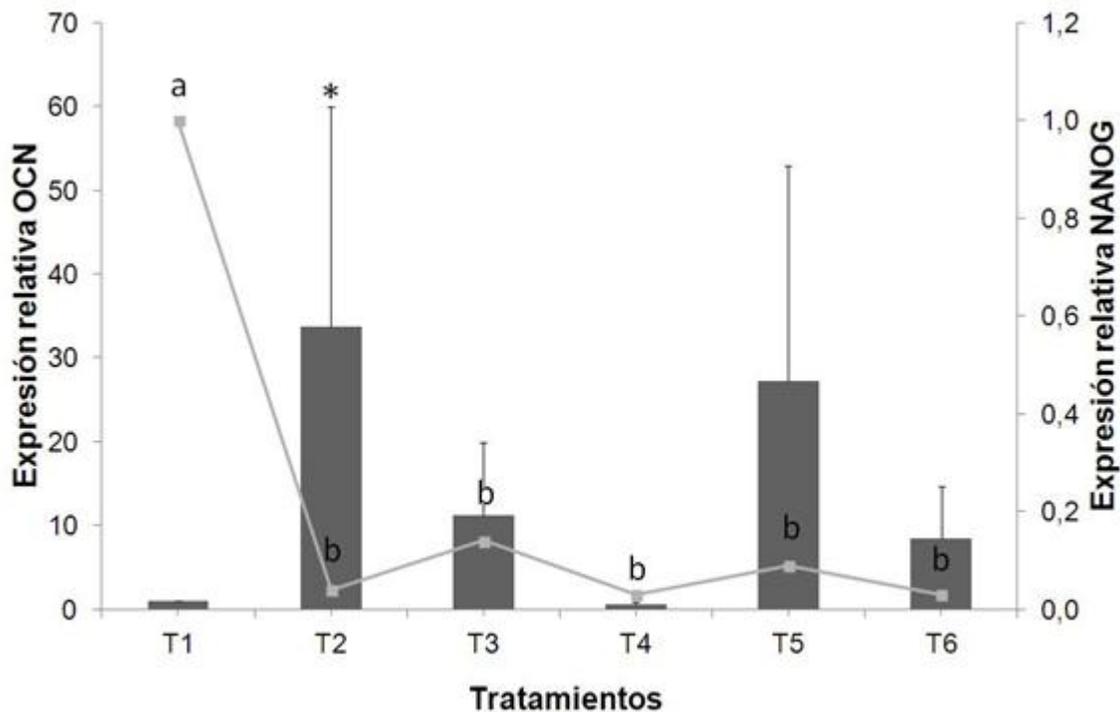


Figura 2 Expresión relativa de OCN y NANOG en CMM bovinas tratadas con distintas concentraciones de SFB y AA durante un periodo de 21 días de diferenciación osteogénica. Para OCN se detectaron los mayores ($P < 0,05$) niveles de expresión en el T2 (0,1mM AA - 10%SFB), en comparación con el resto de los tratamientos. Los mayores ($P < 0,05$) niveles de expresión de NANOG se observaron en T1 en comparación con el resto de los tratamientos (T2, T4 (0,001 mM AA - 10%SFB), T6 (0,1 mM AA - 2% SFB); b). Los distintos superíndices (a, b,*) indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos.

La FA corresponde a una enzima indicadora de diferenciación osteogénica celular, cuya actividad aumenta a medida que los osteoblastos incrementan la formación de depósito de minerales. En el presente estudio se evaluó su actividad en CMM diferenciadas y controles al día 21 de cultivo para cada uno de los tratamientos realizados. La suplementación de SFB y AA indujo un aumento en la actividad de FA, excepto en CMM

suplementadas con 0,001 mM de AA (T4), en donde la actividad de la enzima fue similar a las CMM cultivadas sin AA (T1) (Figura 3).

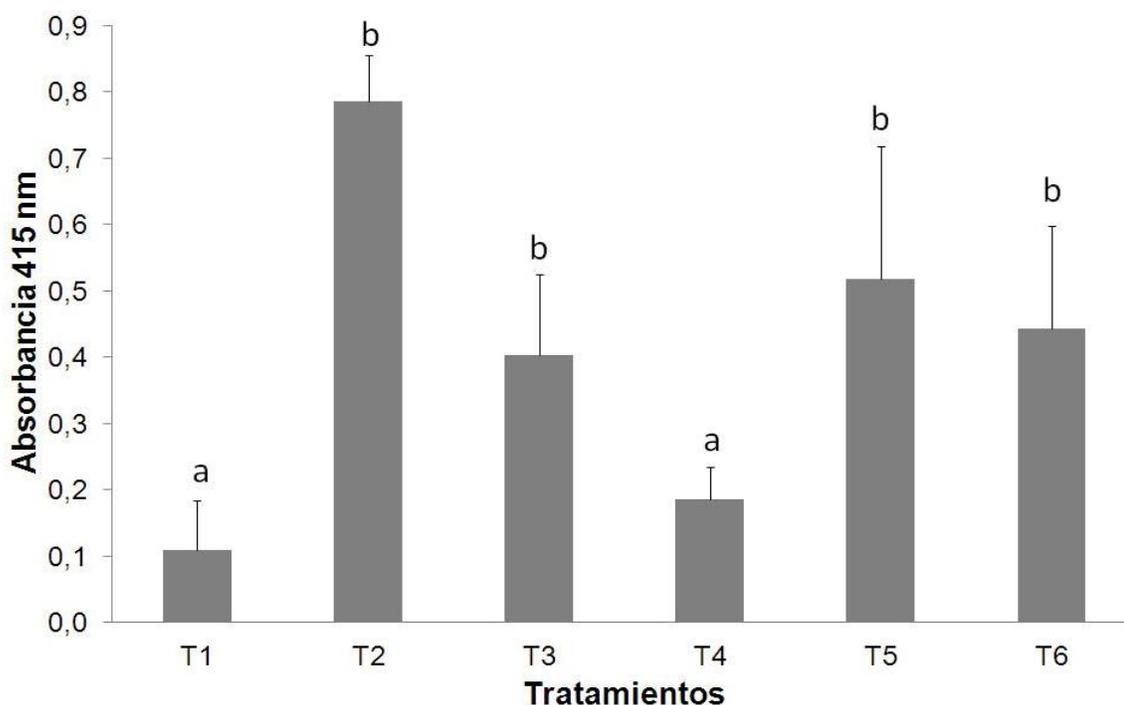


Figura 3 Actividad de FA en CMM tratadas con distintas concentraciones de SFB y AA durante un periodo de 21 días de diferenciación osteogénica. Se determinó un aumento significativo en la actividad de la enzima FA en cultivos celulares suplementados con AA y SFB a excepción de los cultivos suplementados con 0,001 mM de AA (T4). Los distintos superíndices (a, b) indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos.

La presencia de depósitos de minerales en las CMM diferenciadas fue determinada mediante la tinción de Von Kossa. Esta tinción consiste en la sustitución de los iones de Calcio (Ca^{+}) presentes en la muestra por átomos de Plata (Ag), la que al ser expuesta a la luz se reduce y adquiere un color negro (Choi *et al.*, 2008). En la (Figura 4) se muestran los cultivos de CMM bovinas expuestos a distintas concentraciones de AA y SFB teñidos con Von Kossa. En los tratamientos T2 y T5 se observa una marcada intensidad en la tinción en comparación con los otros tratamientos. Se aprecia una disminución en la intensidad de tinción al disminuir la concentración de SFB y AA.

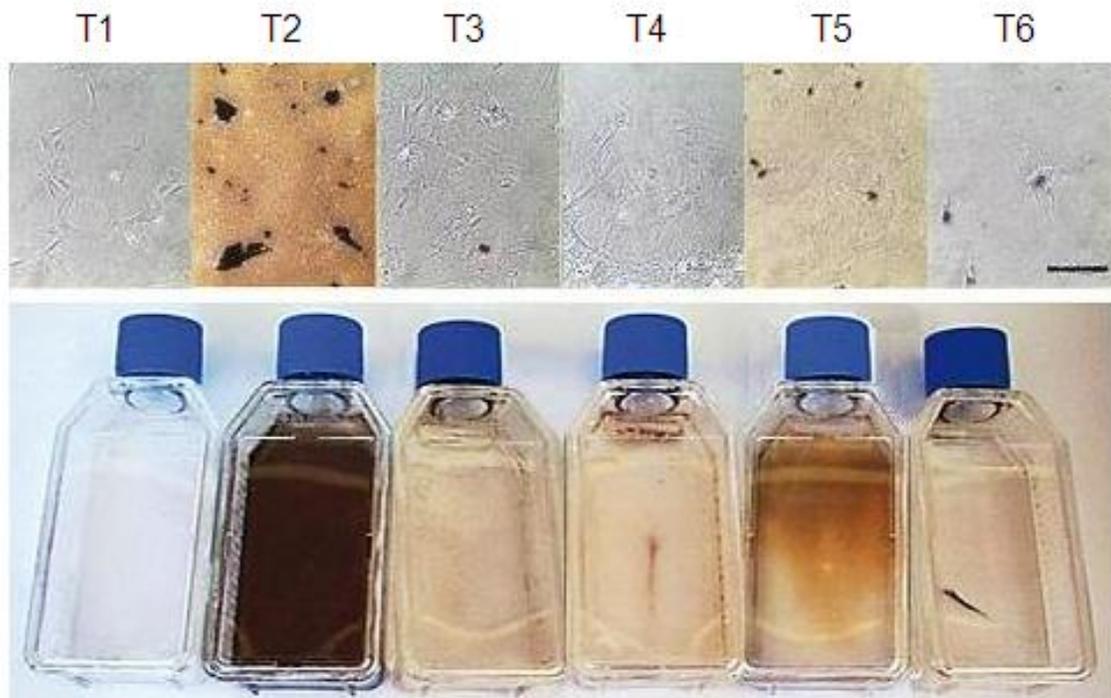


Figura 4 Detección de depósitos de minerales mediante tinción de Von Kossa en CMM expuestas a distintas concentraciones de AA y SFB durante 21 días de diferenciación osteogénica. Se observó una disminución gradual en la tinción de Von Kossa al reducir las concentraciones de SFB y AA. La mayor intensidad de tinción fue observada en T2. Barra de escala = 200 μ m.

La expresión de la proteína de OCN fue inmunodetectada al día 21 de cultivo. La mayor intensidad de fluorescencia asociada a OCN se observó en T2. En T3 y T4 se aprecia una muy baja intensidad y en T5 y T6 se percibe mayor intensidad de fluorescencia que en T3 y T4. La fluorescencia asociada a OCN se observa asociada a agregados celulares. (Figura 5).

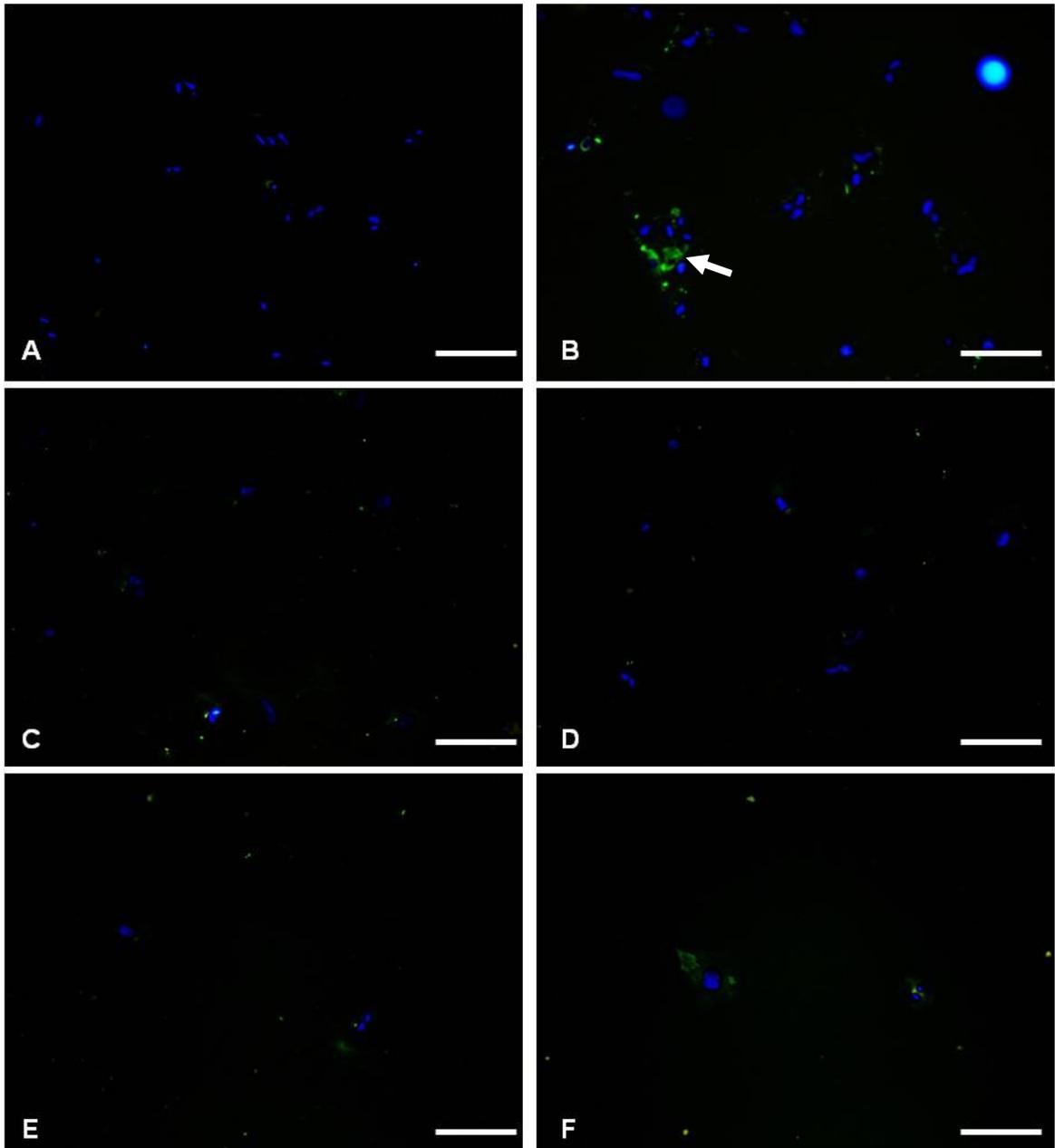


Figura 5 Inmunofluorescencia asociada a OCN en CMM bovinas expuestas a distintas concentraciones de AA y SFB durante 21 días de diferenciación osteogénica. Los distintos tratamientos contenían concentraciones variables de AA y SFB y correspondieron a: T1 (A), T2 (B), T3 (C), T4 (D), T5 (E) y T6 (F). Se observa una mayor intensidad de fluorescencia específica en T2 (flecha blanca). Barra de escala= 200 μ m.

4 Discusión

Las células madre han sido objeto de estudio durante varias décadas, con el propósito principal de ser usadas como fuente de reparación tisular en diversas patologías. Para este propósito es necesario ampliar la información disponible sobre la caracterización

biológica *in vitro* de las CMM en diversos modelos animales, así como de los distintos tipos de cultivos para su diferenciación. Con el fin de caracterizar la biología de las CMM bovinas y de optimizar los cultivos de CMM de esta especie, se planteó el presente estudio, cuyo objetivo fue el de determinar el efecto de distintas concentraciones de SFB y AA sobre la diferenciación osteogénica de CMM bovinas. Mediante técnicas de cultivo previamente descritas (Bosnakovski *et al.*, 2005; Choi *et al.*; 2008) se logró aislar CMM desde médula ósea extraída de fetos bovinos de entre 8 a 9 meses de gestación, provenientes de una planta faenadora. Las CMM fueron seleccionadas desde el contenido medular mediante su capacidad de adherencia al plástico y posteriormente fueron identificadas en base a su morfología fibroblástica. Las CMM aisladas en nuestro estudio tuvieron una morfología coincidente con la descrita previamente para otras especies (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Violini *et al.*, 2009).

Es conocido que la médula ósea alberga una población heterogénea de células, entre las que se encuentran dos poblaciones de células madre: células madre hematopoyéticas (CMH) y CMM (Tropel *et al.*, 2003). Las CMM se encuentran en el estroma de la médula ósea y constituyen una población completamente diferente a las CMH. Se estima que representan aproximadamente el 0,001 – 0,01% de la población celular en la médula ósea de un individuo adulto (Pittenger *et al.*, 1999). Estas células no poseen un marcador único que pueda utilizarse de manera fiable para su aislamiento (Docheva *et al.*, 2007). Sin embargo, la capacidad que poseen de adherirse al plástico de manera persistente es única entre las células de la médula ósea (Tropel *et al.*, 2003; Docheva *et al.*, 2007). Se han descrito otros métodos para aislar CMM como la citometría de flujo y las esferas micromagnéticas, (Bosnakovski *et al.*, 2004; Hombach-Klonisch *et al.*, 2008); sin embargo el aislamiento mediante adherencia al plástico es un método eficiente y de bajo costo (Chen *et al.*, 2008).

La diferenciación de las CMM depende en gran medida de las condiciones de cultivo *in vitro*. Se han descrito previamente una serie de factores inductores de linaje osteogénico; entre los que se encuentran la Dexametasona (Cheng *et al.*, 1994), el β - Glicerofosfato y el AA (Jaiswal *et al.*, 1997; Vater *et al.*, 2011). La Dexametasona es un glucocorticoide que estimula la proliferación de las CMM permitiendo la diferenciación hacia el linaje osteogénico, regulando la activación de la proteína RUNX 2, mediante la fosforilación de un residuo de serina, la cual regula la expresión y activación de genes de *OCN* y *BSP* (Cheng *et al.*, 1994). Además, RUNX 2 dirige la diferenciación osteogénica, uniéndose a

elementos específicos del osteoblasto, estimulando así la actividad de la FA y el depósito de minerales en el interior de las células, produciendo la diferenciación osteoblástica (Cheng *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 2006). El β - Glicerofosfato es utilizado por los osteoblastos como una fuente de fosfato orgánico, el cual participa en el proceso de mineralización de la matriz extracelular, siendo el sustrato para la enzima FA (Vater *et al.*, 2011). Finalmente el AA desempeña un papel crucial en el incremento de la actividad de la FA, promoviendo la producción de OCN y a su vez participando como cofactor en la hidroxilación de aminoácidos y en el procesamiento del procolágeno (Xiao *et al.*, 1997). La síntesis del colágeno, requiere de la hidroxilación de residuos de prolina y lisina en el retículo endoplasmático de los osteoblastos (Xiao *et al.*, 1997). Las enzimas hidroxilasas, que catalizan esta reacción, requieren de AA para funcionar correctamente (Xiao *et al.*, 1997). Esta hidroxilación es indispensable para la formación de la triple hélice de las fibras de colágeno que permite mantener la estructura del tejido óseo (Xiao *et al.*, 1997). Por lo tanto, el AA podría modular la formación del COL1 en CMM bovinas, estimulando la transcripción del procolágeno promoviendo la síntesis de la matriz extracelular (Xiao *et al.*, 1997).

Con el fin de evaluar y comparar los cambios en la morfología celular, asociados al proceso de diferenciación osteogénica, se realizó un seguimiento mediante microscopia durante los 21 días de cultivo. Este seguimiento permitió detectar a partir del sexto día, cambios en la morfología de CMM caracterizados por la aparición progresiva de proyecciones celulares y un aumento en la formación de matriz extracelular. Estas observaciones confirman que tanto la suplementación de AA como de SFB producen un cambio morfológico en las CMM bovinas, el cual puede ser interpretado como una manifestación de diferenciación celular.

La OCN es una proteína producida únicamente por el osteoblasto durante el proceso osteogénico y su expresión está altamente restringida al tejido óseo donde participa de la mineralización (Owen *et al.*, 1990). En este estudio los mayores niveles de ARNm del gen osteo-específico OCN se detectaron en las CMM del T2. Las concentraciones de AA usadas en este tratamiento (0,1mM) han sido previamente utilizadas para diferenciación osteogénica en otras especies, incluyendo la humana (Pittenger *et al.*, 1999), murina (Jaiswal *et al.*, 1997), porcina (Bosnakovski *et al.*, 2005) y equina (Violini *et al.*, 2009). La expresión de OCN fue baja en los cultivos de CMM suplementados con la menor concentración de AA (0,001 mM de AA; T4). Esto podría deberse a que las enzimas que

participan directamente en la formación de tejido óseo requieren de la función del AA como cofactor enzimático para el proceso de osteogénesis (Xiao *et al.*, 1997). Por lo tanto, una baja dosis de AA en el medio de diferenciación limita la síntesis de matriz extracelular y de producción de OCN. En nuestro estudio, al disminuir la suplementación de SFB en un 5% y 2%, se observa una disminución en la expresión relativa de OCN, esto podría deberse a que, el SFB es una importante fuente de factores de crecimiento que promueven el metabolismo celular (Mucci *et al.*, 2006; Lindroos *et al.*, 2010). Las altas concentración de factores de crecimiento, otorgados por la suplementación de SFB, podrían estimular la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, incrementando de manera indirecta la formación de depósito de minerales. Sin embargo, en este estudio las distintas concentraciones de SFB no arrojaron diferencias significativas en la expresión de los marcadores osteogénicos.

La señal de inmunofluorescencia específica asociada a OCN fue observada principalmente en las células del T2 (0,1 mM AA - 10%SFB). Estos resultados reafirman los entregados por Q-PCR en donde los mayores niveles de ARNm de OCN se evidenciaron en este tratamiento. Este resultado indica que el gen OCN se expresa a nivel de ARNm y de proteína en las células de este cultivo. En los otros tratamientos, no se detectó una señal marcada de fluorescencia específica. Esto podría deberse a que la expresión de OCN fue muy baja en estos tratamientos, lo que dificultaría la detección de manera significativa por los anticuerpos.

Los niveles del gen de pluripotencia *NANOG* fueron evaluados con el fin de estimar la pérdida de la capacidad multipotente de las CMM, durante el proceso de diferenciación celular en los distintos tratamientos (Kyung *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos detectaron una disminución en los niveles de ARNm de *NANOG* en CMM para todos los tratamientos suplementados con AA y SFB. Esto confirma, que ambos factores estimulan la pérdida del estado multipotente promoviendo el proceso de diferenciación celular. Estos resultados coinciden con estudios en otras especies, en donde se describe que la expresión relativa de *NANOG* se ve afectada directamente por las condiciones de cultivo de las células (Pierantozzi *et al.*, 2011).

La FA es una enzima que desempeña un papel fundamental en el proceso de depósito de minerales, así como también juega un rol importante en la proliferación celular y en la secreción de matriz proteica de los osteoblastos (Yang *et al.*, 2003). La FA es utilizada

como uno de los principales marcadores bioquímicos para demostrar la actividad osteoblástica de las células (Yang *et al.*, 2003). En el proceso de diferenciación osteogénica, la FA requiere del AA para llevar a cabo la síntesis de colágeno (Xiao *et al.*, 1997). En nuestro estudio, el análisis de FA detectó un aumento en la actividad de esta enzima en CMM tratadas con AA exceptuando en las concentraciones bajas de AA (0,001 mM; T4). Esto se ve reforzado por los resultados de la tinción de Von Kossa, en donde se observa una baja intensidad de la tinción en T4 (0,001 mM AA - 10% SFB). La actividad de la FA se vio aumentada en todos los tratamientos en donde se suplementó SFB y no se evidenció diferencias significativas al disminuir su concentración. Sin embargo, los máximos valores de actividad de FA se identificaron en T2 (0,1 mM AA - 10% SFB), en donde además se observó una aumentada intensidad de la tinción de Von Kossa, indicando un aumento en el depósito de minerales. Los distintos tratamientos muestran una disminución en la actividad de la FA y en la intensidad de tinción Von Kossa, al ir disminuyendo las concentraciones de suplementación del AA. Esto podría deberse al rol protagónico que posee en el proceso de formación de matriz extracelular y en el depósito de minerales.

Nuestros resultados indican que el AA influye en la diferenciación de CMM bovinas hacia linaje osteogénico. Sin embargo, no ejercería un efecto dosis dependiente en la estimulación de la diferenciación celular. En presencia de 0,1 mM de AA, las CMM adquieren cambios morfológicos importantes, forman agregados celulares, aumenta la actividad de FA y se produce matriz extracelular. Esto se daría principalmente porque el AA en esta concentración, juega un papel crucial como cofactor enzimático (Yang *et al.*, 2003). Esto nos entrega un indicio de que la concentración de 0,1 mM de AA actuaría como dosis umbral en la diferenciación osteogénica de CMM bovinas, ya que bajo esta concentración no vemos efectos significativos en la diferenciación. Esto reafirma el efecto positivo que genera el AA en la diferenciación de las células mencionado por otros autores (Xiao *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2003). A su vez la suplementación de SFB muestra los mayores niveles de diferenciación, reflejados en la expresión de OCN, cuando los cultivos se suplementan con SFB al 10% (T2). Al reducir esta suplementación al 5% (T5) y al 2% (T6), se detecta una disminución en los niveles de expresión de OCN. Esto nos lleva a concluir que el SFB afecta de manera parcial la osteogénesis, afectando la expresión de OCN y el depósito de minerales pero no la actividad de la FA.

En el presente estudio se demostró que el AA juega un importante rol como inductor de diferenciación osteogénica de CMM bovinas. La suplementación de AA estimula la síntesis de matriz extracelular, la actividad de la FA y el depósito de minerales. Por su parte el SFB participa parcialmente en la diferenciación osteogénica estimulando la síntesis de matriz extracelular y el depósito de minerales, pero no la actividad de la FA. Por consiguiente, la dosificación de 0,1 mM de AA a cultivos de CMM bovinas, permite maximizar la expresión de *OCN*, la actividad de la FA y el depósito de minerales disminuyendo a su vez la expresión de *NANOG*. Finalmente, esta concentración de AA en el medio de cultivo permite optimizar la diferenciación de las CMM bovinas hacia el linaje osteogénico.

5 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT (proyecto N 11100205) del Ministerio de Educación del Gobierno de Chile. Se agradece a Faenadora y Frigorífico Cordillera S.A., al Centro Biotecnológico Veterinario (Biovetec) FAVET-UCH y al Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencia de los Materiales (CIMAT) FAVET-UCH por su colaboración en este estudio y al equipo de trabajo del Laboratorio de Células Madre FAVET-UCH.

6 Bibliografía

- **BIEBACK, K.; KERN, S.; KLÜTER, H.; EICHLER, H.** 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22:625-634.
- **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.
- **CHEN, Y.; SHAO, J.; XIANG, L.; DONG, X.; ZHANG, G.** 2008. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Biochemistry & Cell Biology* 40:815–820.
- **CHENG, S.; YANG, J.; RIFAS, L.; ZHANG, S.; AVIOLI, L.** 1994. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134:277-286.

- **CHOI, KM.; SEO, YK.; YOON, HH.; SONG, KY.; KWON, SY.; LEE, HS.; PARK, JK.** 2008. Effect of Ascorbic Acid on Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation. *J Biosci Bioeng.* 105(6):586-594.

- **DOCHEVA, D.; POPOV, C.; MUTSCHLER, W.; SCHIEKER, M.** 2007. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med.* 11: 21.

- **DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M.** 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8(4):315-317.

- **DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A.; KARSENTY, G.** 1997. *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation.* *Cell* 89(5):747-754.

- **FRAISER, K.; WULLUR, I.; ALFONSO, Z.; HENDRICK, H.** 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150-154.

- **GO, M.J.; TAKENAKA, C.; OHQUSHI, H.** 2008. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res* 314: 1147-1154.

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

- **ITURRIAGA, M.** 2003. *Pesquisa de contaminantes de origen viral, en sueros comerciales de origen bovino y equino. Memoria título Médico Veterinario.* Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 47.

- **JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.; CAPLAN, A.; BRUDER, S.** 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64(2):295-312.

- **KOLF, C.; CHO, E.; TUAN, R.** 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 9:204.

- **KYUNG, CH.; YOUNG, S.; HEE, Y.; KYE, S.; K.; HWA, L.; JUNG, P.** 2008. Effect of Ascorbic Acid on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation. *J of Bioscience and Bioengineering* 105 (6):586- 594.

- **LEE, J.; PARRETT, B.; CONEJERO, J.; LASER, J.; CHEN, J.; KOGON, A.; NANDA, D.; GRANT, RT.; BREITBART, AS.** 2003. Biological alchemy: Engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50(6):610-617.

- **LINDROOS, B.; AHO, K.; KUOKKANEN, H.; RATY, S.; HUHTALA, H.; LEMPONEN, R.; YLI-HARJA, O.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S.** 2010. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Eng* 16(7):2281-2294.

- **LIU, Y.; CHEN, F.; LIU, W.; CUI, L.; SHANG, Q.; XIA, W.; WANG, J.; CUI, Y.; YANG, G.; LIU, D.; WU, J.; XU, R.; BUONOCORE, SD.; CAO, Y.** 2009. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng* 8:709–721.

- **MIYANARI, Y.; TORRES, M.** 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. *Nature* 470- 483.

- **MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.; HOZBOR, F.; ALBERIO, R.** 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch Med Vet.* 38(2): 97- 104.

- **OWEN, T.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L.; WILMING, L.; TASSINARI, M.; KENNEDY, MB.; POCKWINSE, S.; LIAN, JB.; STEIN, GS.** 1990. Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype *In vitro* – Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation During Formation of the Bone Extracellular-Matrix. *J Cell Physiol* 143(3):420-430.

- **PHILLIPS, J.; GERSBACH, C.; WOJTOWICZ, A.; GARCÍA A.** 2006. Glucocorticoid induced osteogenesis is negatively regulated by runx 2/ cbfa 1 serine phosphorylation. *J Cell Sci* 119: 581 – 591.

- **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 not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells and Development* 20(5): 915-923.

- **PITTENGER, 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.

- **RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.; HE, B.; CHEN, L.; ZUO, G.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.; KIM, S.; ZHOU, J.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R.; LUU, H.; HAYDON, R.; DENG, Z.; HE, T.** 2010. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2: 67-80.

- **SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T.** 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues. *Arthritis Rheum*. 52:2521-2529.

- **STEIN, G.; LIAN, J.; VAN WIJNEN, A.; STEIN, J.; MONTECINO, M.; JAVED, A.; ZAIDI, SK.; YOUNG, DW.; CHOI, JY.; POCKWINSE, SM.** 2004. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23(24):4315-4329.

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

- **VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; FEX SVENNINGSEN, A.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, LE.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, ML.; GSTRAUNTHALER, G.** 2010. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol In Vitro* 24(4):1053-1063.

- **VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M.** 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7(2):463-477.

- **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

- **XIAO, G.; CUI, Y.; DUCI, P.; KARSENTY, G.; FRANZENCHI, RT.** 1997. Ascorbic acid dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3- E1 Preosteoblasts: Requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol Endocrinol*. 11(8):1103-1113.

- **YANG, L.; TAO, TZ.; WANG, XT.; DU, N.; CHEN, WZ.; TAO, SQ.; WANG, Z.; WU, L.** 2003. Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts *in vitro*. Chin Med J. 116(9):1357-1360.
- **ZHANG, Z.; TEOH, S.; CHONG, M.; SCHANTZ, J.; FISK, N.; CHAN, J.** 2009. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. Stem Cells 27: 126-137.