



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

**DIFERENCIACIÓN GERMINAL *IN VITRO* DE**  
**CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS**  
**DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

**JAHAIRA AZUCENA CORTEZ CHICA**

Tesis para optar al Título de  
Magister en Ciencias  
Animales y Veterinarias

**Santiago-Chile**

**2017**



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

**DIFERENCIACIÓN GERMINAL *IN VITRO* DE  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS  
DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

**JAHAIRA AZUCENA CORTEZ CHICA**

Tesis para optar al Título de  
Magister en Ciencias Animales y  
Veterinarias

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

**SANTIAGO, CHILE**

**2017**



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

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

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

**Jahaira Azucena Cortez Chica**

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. ÓSCAR PERALTA T. ....

**COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS**

DRA. LORENA AGUILAR .....

DRA. MA. SOLEDAD FERNÁNDEZ .....

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

Proyecto FONDECYT N° 1161251 y  
Programa de becas “Convocatoria Abierta 2013” – SENESCYT, Ecuador

## **BIOGRAFÍA**

Nacida un 28 de enero de 1986 en la ciudad de Esmeraldas, provincia de Esmeraldas, Ecuador. Terminé mi educación primaria en la Escuela Cristiana Bilingüe Belén-Manta-Manabí en el año 1997. Terminé mi educación secundaria en el Colegio Gabriela Mistral-Manta-Manabí en el año 2003. Ingresando a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Manabí- Portoviejo en el año 2004, egresando en el año 2010 y obteniendo el grado de Médico Veterinario y Zootecnista en el 2011. Ingresé al Programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias el año 2014.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **UNIVERSIDAD DE CHILE**, y muy especialmente a la **FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**, por darme la oportunidad de realizar mi formación académica de postgrado en el programa de **MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS**.

A la República de Ecuador a través del Programa de Becas “Convocatoria Abierta 2013” de la Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología, **SENESCYT**, por financiar mis estudios de magister y la investigación.

Al proyecto del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, **FONDECYT N° 1161251**. Perteneciente al ministerio de Educación de Chile, por financiar la parte experimental del presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Oscar Peralta Troncoso**, director del presente trabajo de investigación, por su buena disposición, paciencia. Su apoyo y colaboración me permitieron culminar este trabajo de manera satisfactoria.

A la **Dra. Javiera Bahamonde Azcuy**, por su disponibilidad y dedicación para transmitirme sus conocimientos, los cuales fueron parte fundamental en la realización de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de reproducción de la facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias y su responsable la **Dra. Mónica de los Reyes**, al **Dr. Jaime Palominos** y **Dr. Cristian Torres** por su disponibilidad y ayuda durante la ejecución de este trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos de laboratorio **Miguel Jervis, Olger Huaman, Berly Cahauascano y Moisés Segunda** por el trabajo en equipo durante la parte experimental y la compañía durante toda esta experiencia.

Y un agradecimiento especial a mi mamá y mi familia por su amor y apoyo incondicional, a mi amiga Samira por las risas y buenos momentos a pesar de la distancia y a Francesco por su compañía durante esta experiencia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Biografía .....	5
Agradecimientos.....	6
Índice de ayudas ilustrativas .....	9
Lista abreviaciones.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	13
1. Introducción.....	14
2. Revisión bibliográfica.....	17
2.1. Células madre mesenquimáticas.....	17
2.2. Diferenciación y plasticidad celular de MSC.....	18
2.3. BMP4, TGF $\beta$ 1 y ácido retinoico como potenciales factores de diferenciación germinal.....	20
2.4. Mecanismos de regulación en la diferenciación germinal.....	23
2.5. Diferenciación germinal en las MSC y sus aplicaciones.....	27
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos.....	29
4.1. Objetivo General.....	29
4.2. Objetivos Específicos.....	29
5. Materiales y Métodos.....	30
5.1. Obtención y aislamiento de MSC-MO fetales bovinas.....	30
5.2. Cultivo y diferenciación germinal <i>in vitro</i> de MSC-MO fetales bovinas.....	31
5.3. Cuantificación de niveles de mRNA de genes germinales en MSC-MO fetales bovinas mediante PCR cuantitativo (Q-PCR)	32
5.4. Análisis de marcadores germinales y de pluripotencia en MSC- MO fetales bovinas mediante citometría de flujo.....	35
5.5. Análisis estadísticos.....	36
6. Resultados.....	37

6.1.	Aislamiento y cultivo de MSC-MO fetales bovinas.....	37
6.2.	Determinación del efecto de AR sobre la diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas.....	38
6.2.1.	Efecto dosis-respuesta del AR sobre la morfología de MSC-MO fetales bovinas.....	38
6.2.2.	Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y germinales en MSC-MO fetales bovinas expuestas a AR.....	40
6.2.3.	Expresión de los marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO expuestas a AR.....	41
6.3.	Determinación del efecto de BMP4 en la diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas.....	43
6.3.1.	Efecto dosis-respuesta del BMP4 sobre la morfología de MSC-MO fetales bovinas.....	43
6.3.2.	Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y germinales en MSC-MO fetales bovinas expuestas a BMP4 .....	44
6.3.3.	Expresión de los marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO expuestas a BMP4 .....	46
6.4.	Determinación del efecto de TGFβ1 en la diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas.....	48
6.4.1.	Efecto dosis-respuesta del TGFβ1 sobre la morfología de MSC-MO fetales bovinas.....	48
6.4.2.	Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y germinales en MSC-MO fetales bovinas expuestas a TGFβ1.....	49
6.4.3.	Expresión de marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO expuestas a TGFβ1 .....	51
6.5.	Cuantificación de los niveles de mRNA del marcador de meiosis SCP3 en MSC-MO fetales bovinas tratadas con AR, BMP4 o TGFβ1.....	53
7.	Discusión.....	55
8.	Bibliografía.....	62

# ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

## TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Secuencia de partidores utilizados para el análisis por Q-PCR.....	34
<b>Tabla 2.</b> Genes evaluados en las MSC-MO tratadas con AR, BMP4 o TGFβ1.....	54

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> MSC-MO fetales bovinas adheridas al plástico en condiciones estándares de cultivo.....	37
<b>Figura 2.</b> Cambios morfológicos de MSC-MO fetales bovinas durante el tratamiento con tres concentraciones diferentes de AR .....	39
<b>Figura 3.</b> Expresión de los genes DAZL, NANOG y OCT4 en MSC-MO fetales bovinas tratadas con AR .....	40
<b>Figura 4.</b> Aumento de la expresión del marcador germinal (Dazl) y disminución del marcador de pluripotencia Oct4 en MSC-MO fetales bovinas tratadas con AR .....	42
<b>Figura 5.</b> Cambios morfológicos de MSC-MO fetales bovinas durante el tratamiento con tres concentraciones diferentes de BMP4.....	44
<b>Figura 6.</b> Expresión de los genes DAZL, NANOG y OCT4 en MSC-MO fetales bovinas tratadas con BMP4 .....	45
<b>Figura 7.</b> Expresión del marcador germinal (Dazl) y de pluripotencia (Nanog y Oct4) mediante citometría de flujo (Dotplot) en MSC-MO fetales bovinas expuestas a BMP4.....	47
<b>Figura 8.</b> Cambios morfológicos de MSC-MO fetales bovinas durante el tratamiento con tres concentraciones diferentes de TGFβ1.....	49
<b>Figura 9.</b> Expresión de los genes DAZL, NANOG y OCT4 en MSC-MO fetales bovinas tratadas con TGFβ1.....	50
<b>Figura 10.</b> Disminución de la expresión del marcador Nanog en MSC-MO fetales bovinas expuestas a TGFβ1 durante 21 días de cultivo .....	52
<b>Figura 11.</b> Niveles de mRNA de SCP3 en MSC-MO fetales bovinas cultivadas por 21 días en medio de cultivo suplementado con AR, BMP4 o TGFβ1.....	53

## ABREVIATURAS

AGM	Región aorta-gonadal mesonéfrico
AR	Ácido retinoico
BMP	Proteínas morfogénica óseas
BMP4	Proteína morfogénica ósea 4
BSA	Albúmina sérica bovina
CO	Control (cultivo)
DAZL	Deleted in Azoospermia-like
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Día 0
dpc	Días post coito
ExE	Ectodermo extraembrionario
ESC	Células madre embrionarias
HSC	Células madres hematopoyéticas
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
MSC	Células madre mesenquimáticas
MSC-MO	Células madre mesenquimáticas provenientes de médula ósea
PBS	Phosphate-buffered saline
PGC	Células germinales primordiales
TGF $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
SCP3	Proteína del complejo sinaptonémico 3
SC	Complejo sinaptonémico
SFB	Suero fetal bovino

## RESUMEN

Las células madre mesenquimáticas (MSC, del inglés, Mesenchymal Stem Cells) son células progenitoras adultas capaces de diferenciarse hacia células de tejidos mesodérmicos y que además poseen potencial de auto-renovación y morfología fibroblastoide. Como parte de su capacidad de diferenciación multilinaje, estudios recientes han demostrado que las MSC cuentan con la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia linaje celular germinal. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de diferenciación germinal de MSC derivadas de médula ósea fetales bovinas (MSC-MO) mediante exposición *in vitro* a los biofactores proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) y ácido retinoico (AR). Las MSC-MO fueron aisladas mediante adherencia a placas de cultivo de plástico desde médula ósea de fetos bovinos (7-9 meses de gestación, n=14). El efecto dosis-respuesta fue analizado luego de 21 días de cultivo utilizando tres concentraciones de BMP4 (10, 50, 100 ng/mL), TGF $\beta 1$  (1, 10, 100 ng/mL) y AR (0,01; 0,1 y 1  $\mu$ M). El efecto temporal fue analizado en los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo utilizando 100 ng/mL de BMP4, 100 ng/mL de TGF $\beta 1$  o 0,1  $\mu$ M de AR. Se analizaron los genes de pluripotencia *OCT4*, *NANOG*, genes germinales *FRAGILIS*, *STELLA*, *VASA* y genes germinales de macho *DAZL*, *PIWIL2*, *STRA8* y el marcador de meiosis *SCP3* mediante PCR cuantitativo (Q-PCR). La expresión de *Dazl*, *Nanog* y *Oct4* fue analizada mediante citometría de flujo. El tratamiento con AR y BMP4 aumentó la expresión génica de *DAZL* ( $P < 0,05$ ) a partir del día 7. Sin embargo, el aumento bajo el efecto de BMP4 fue transitorio. TGF $\beta 1$  no modificó la expresión de mRNA de *DAZL*. La suplementación con AR activó la expresión de mRNA de *NANOG* a partir del día 7 hasta el día 21 de exposición, pero no se observaron cambios de expresión bajo el efecto de BMP4 durante el período de cultivo. Los niveles de mRNA de *OCT4* y de *SCP3* no fueron modificados bajo el efecto de ninguno de los factores utilizados. En conclusión, AR fue el biofactor más efectivo en la diferenciación germinal de MSC-MO logrando el aumento de la expresión del gen germinal *DAZL*.

**Palabras Claves:** Células madre mesenquimáticas, Diferenciación germinal, Ácido retinoico, Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1, proteína morfogénica ósea 4.

## ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSC) are adult progenitor cells that possess self-renewal capacity and fibroblastoid morphology and are also capable of differentiating into cells of mesodermal tissues. In addition to the multilineage differentiation potential, recent studies have shown that MSCs can differentiate *in vitro* into germ cell lineage. The objective of the present study was to evaluate the potential for germ cell differentiation of MSCs derived from fetal bovine bone marrow (BM-MSC) by *in vitro* exposure to bioactive factors bone morphogenetic 4 (BMP4), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) and retinoic acid (RA). BM-MSC were isolated by adherence to plastic culture plates from bone marrow of bovine fetuses (7-9 months gestation, n = 14). The dose-response effect of each factor was analyzed using three concentrations of BMP4 (10, 50, 100 ng / mL), TGF $\beta$ 1 (1, 10, 100 ng / mL) and RA (0.01, 0.1 and 1  $\mu$ M), after 21 days of culture. The temporal effect was analyzed on days 0, 7, 14 and 21 of culture using 100 ng/mL of BMP4, 100 ng/mL of TGF $\beta$ 1 or 0,1  $\mu$ M of RA. The pluripotency genes *OCT4*, *NANOG*, germ cell genes *FRAGILIS*, *STELLA*, *VASA* and male germ cell genes *DAZL*, *PIWIL2*, *STRA8* and the meiosis marker *SCP3* were analyzed by quantitative PCR (Q-PCR). The expression of *Dazl*, *Nanog* and *Oct4* was analyzed by flow cytometry. Treatment with AR and BMP4 increased *DAZL* gene expression (P <0.05) from day 7, however the increase under the effect of BMP4 was transient. TGF $\beta$ 1 did not modify the expression of *DAZL* mRNA. Supplementation with RA activated *NANOG* mRNA expression from day 7 to day 21 of exposure, but no expression changes were observed under the effect of BMP4 during the culture period. *OCT4* mRNA levels are not modified under the effect of any of the factors as well as the *SCP3* meiosis marker. In conclusion, AR was the most effective biofactor in the germ differentiation of BM-MSC achieving increased expression of the *DAZL* germline gene.

**Key Words:** Mesenchymal stem cells, Germ cell differentiation, Retinoic acid, Transforming growth factor  $\beta$ 1, Bone morphogenic protein 4.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimáticas (MSC, del inglés, Mesenchymal Stem Cells), también conocidas como células estromales o mesenquimales multipotenciales, fueron inicialmente descritas como células de origen mesodermal con morfología fibroblastoide y capacidad clonogénica (Friedenstein et al., 1974). Posteriormente se determinó que las MSC poseen propiedades adicionales, como capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación hacia linajes celulares de origen mesodérmico como osteocitos, adipocitos y condrocitos (Caplan, 1991). Dadas estas propiedades y considerando su facilidad de aislamiento y expansión bajo condiciones *in vitro*, las MSC han sido destacadas como una potencial herramienta para terapia celular y medicina regenerativa.

A pesar de que las MSC son células multipotenciales, con capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos, estudios recientes han permitido establecer que estas células cuentan con un mayor espectro de diferenciación. Este potencial ha sido descrito recientemente en MSC derivadas de médula ósea (MSC-MO) humana, murina y ovina en presencia de factores inductores *in vitro* (Hua et al., 2009; Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014; Nayernia et al., 2006). Esto ha abierto una nueva perspectiva sobre el potencial desarrollo de gametos para reproducción humana y animal. Sin embargo, el proceso de diferenciación germinal es altamente complejo y requiere de la participación de múltiples factores de diferenciación celular. La proteína morfogénica ósea 4 (BMP4) es un factor de crecimiento primordial en la inducción del conjunto de células del epiblasto que dan origen a la línea germinal durante el desarrollo embrionario (Lawson et al., 1999). BMP4 induce a este conjunto de células a expresar la proteína de maduración de linfocitos B (BLIMP1), un potente factor transcripcional que reprime la expresión de genes somáticos y regula la expresión de genes necesarios para la especificación de las células germinales primordiales (PGC) (Kurimoto et al., 2008). BMP4 además induce la expresión de la proteína transmembrana inducida por interferón (PRDM14) que promueve la

readquisición de pluripotencialidad en las PGC y es un factor necesario para la expresión de otros genes germinales como *STELLA* (PGC7 o Dppa3, Developmental pluripotency associated 3), *SOX2* también conocido como SRY-box 2 (del inglés, Sex determining Region Y-box 2) y *FRAGILIS* (IFITM3) (Kurimoto et al., 2008). Posteriormente, *BMP4* induce en las PGC la expresión de otros genes germinales como *DAZL* (del inglés, Deleted in Azoospermia-Like), *VASA* también conocido como DEAD-box helicase 4 y el receptor tirosina quinasa C-Kit o CD117 que son necesarios para el proceso de proliferación, supervivencia y migración de estas células hacia la cresta genital (Lawson et al., 1999). El factor de crecimiento transformante beta 1 ( $TGF\beta 1$ ) es una citoquina multifactorial que está involucrada en la regulación de la proliferación y diferenciación de varias líneas celulares (Ingman y Robertson, 2007). Tiene un papel crucial en la maduración de los testículos, espermatogénesis y además participa en la regulación de la esteroideogénesis, el desarrollo y funcionamiento de los órganos reproductivos secundarios (Ingman y Robertson, 2002). Su función en estos procesos reproductivos ha sido comprobada a través de varios estudios, lo que demuestra su importancia (Ingman y Robertson, 2002). Por otra parte, el ácido retinoico (AR) es un metabolito activo de la vitamina A cuyo exceso o deficiencia a nivel plasmático ha sido asociada a desórdenes en la gametogénesis de varias especies (Busada y Geyer, 2016). El AR está involucrado en los procesos de proliferación, diferenciación celular y apoptosis durante la gametogénesis (Bowles et al., 2006). Además, en la espermatogénesis controla el reingreso al ciclo celular de las espermatogonias tipo A para diferenciarse en espermatogonias A1, convirtiéndolo en un factor indispensable en la formación de los gametos (Zhou et al., 2008).

El desarrollo de la tecnología de producción *in vitro* de células germinales desde MSC, podría tener un gran impacto en el tratamiento de infertilidad en distintas especies, especialmente en seres humanos. En el caso de los animales domésticos como el toro y el perro, la diferenciación *in vitro* de MSC-MO hacia

células germinales abre la posibilidad de desarrollar nuevas biotecnologías para la transmisión de material genético de animales de élite, al permitir el desarrollo de un suministro permanente para su posterior trasplante hacia animales receptores de menor valor productivo (West et al., 2013). En el caso de estas especies, también tendría una aplicación en la producción de animales transgénicos pudiendo ser una herramienta útil para la propagación y conservación de especies en peligro de extinción al mantener, así como potencialmente difundir su material genético (West et al., 2013). Considerando además que la mayor parte de los estudios sobre gametogénesis en animales han sido desarrollados en ratones, el proceso de diferenciación germinal *in vitro* en MSC-MO fetales bovinas permitiría determinar aspectos que aún son desconocidos sobre la gametogénesis en el bovino. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas mediante su exposición *in vitro* a los biofactores BMP4, TGF $\beta$ 1 y AR.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Células madre mesenquimáticas

Las MSC son conocidas como un tipo de célula progenitora adulta capaz de diferenciarse en diferentes linajes mesenquimales como osteogénico, adipogénico y condrogénico (Pittenger, 2011). También han sido conocidas como “células de estroma medular”, “precursores estromales” o “células adultas progenitoras multipotentes (Arévalo et al., 2007). En la etapa embrionaria, las células precursoras de MSC se encuentran en la región aorta-gonadal mesonefros (AGM) (Mendes et al., 2004). Esta región es conocida por ser un microambiente para varios tipos celulares como las células madre hematopoyéticas (HSC) y las PGC (Mendes et al., 2004). En el tejido adulto, las MSC forman parte del estroma medular, donde residen alrededor de sinusoides y mantienen un nicho para las HSC, además de reponer osteoblastos, adipocitos y generar cartílago en condiciones específicas (Bianco et al., 2013). Sin embargo, las MSC no son exclusivas de la médula ósea, ya que también han sido aisladas desde otros tejidos como adiposo, cordón umbilical, hígado fetal, músculo esquelético, piel, membrana sinovial, pulpa dental y ligamento periodontal (De Bari et al., 2001; Shi et al., 2005; Gazit et al., 2013).

La morfología de las MSC ha sido inicialmente descrita como fibroblastoide, sin embargo, su forma puede variar según la fuente de obtención (Arévalo et al., 2007). En este sentido, se ha observado que la mayoría (93%) de las MSC aisladas desde sangre de cordón umbilical poseen una forma redondeada (Chang et al., 2006). Por el contrario, MSC aisladas desde médula ósea presentan una forma mayormente fibroblastoide y estrellada (Muraglia et al., 2000; Campagnoli et al., 2001). Las MSC obtenidas a partir de tejido adiposo presentan una morfología y fenotipo *in vitro* similar a las obtenidas desde médula ósea, pero poseen una mayor capacidad de diferenciación (Kern et al., 2006; Arévalo et al., 2007).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido una serie de requisitos que definen a la población de MSC y que incluyen: 1) capacidad de adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo; 2) potencial de diferenciación hacia linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y; 3) expresión de marcadores de superficie mesenquimal como CD105, CD73, CD90, además de la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD7 $\alpha$ , CD19 y HLA-DR (Dominici et al., 2006). En el caso de las MSC obtenidas de animales domésticos no existe una caracterización específica oficial como en el caso humano. Sin embargo, se ha descrito en las MSC-MO fetales bovinas, que su población adherente al plástico expresa mayoritariamente los marcadores mesenquimáticos CD29 (76,3 %) y CD73 (96,8%) y carece de la expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34 (93,4%) y CD45 (95,6%) (Dueñas et al., 2014).

## **2.2 Diferenciación y plasticidad celular de MSC**

Los primeros estudios sobre potencial de diferenciación de células adultas se remontan a los años 1950 y 1960 realizados por John Gurdon y Ernest Hadorn (Merrell y Stanger, 2016). Estos autores demostraron que algunas células madre adultas podían modificar su función luego de ser trasplantadas hacia otros tejidos (Merrell y Stanger, 2016). A partir de estos estudios se ideó el concepto de plasticidad celular, que se define como la capacidad de una célula madre adulta, obtenida de un tejido específico, para producir otros linajes celulares diferentes al de su origen embrionario (Bernard, 2015). Una gran cantidad de estudios sobre diferenciación en células madre adultas se han realizado en MSC-MO, ya que es considerada como la primera fuente tisular descrita de MSC (Arévalo et al., 2007).

Se han definido algunos tipos de mecanismos por los cuales las MSC realizan su proceso de diferenciación que incluyen la transdiferenciación, desdiferenciación

y transdeterminación. La transdiferenciación se define como la capacidad de MSC de diferenciarse hacia otros tipos de células especializadas, en un proceso caracterizado por la pérdida de marcadores específicos y la adquisición nuevos, así como de funciones asociadas al nuevo tipo celular (Fortier, 2005). La transdiferenciación puede ser directa mediante conversión hacia un nuevo tipo celular o indirecta incluyendo una etapa de desdiferenciación y luego una etapa de re-diferenciación (Merrell y Stanger, 2016). Alternativamente se ha establecido el concepto de transdeterminación que consiste en la generación de un tipo de célula indiferenciada desde una célula progenitora para luego diferenciarse hacia un nuevo linaje celular (Frisén, 2002). El tercer mecanismo consiste en un retroceso en el proceso de diferenciación o desdiferenciación hacia un vástago común o célula progenitora para posteriormente reiniciar el proceso de diferenciación o rediferenciación hacia un tipo celular específico (Frisén, 2002; Wagers y Weissman, 2004).

El potencial de diferenciación hacia linajes mesodermales ha sido ampliamente demostrado *in vitro* en MSC obtenidas de diversos tejidos como MO, tejido adiposo y sangre de cordón umbilical derivados de diferentes especies animales (Gazit et al., 2013). En el caso de las MSC-MO fetales bovinas, nuestro laboratorio ha reportado su capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Cortes et al., 2013). Adicionalmente, estas células son capaces de diferenciarse hacia linajes ectodérmicos como el neuronal y endodérmicos como el hepático (Dueñas et al., 2014). No obstante, para inducir el proceso de diferenciación se requieren señales químicas como factores de crecimiento, citoquinas y fármacos que estimulen la diferenciación *in vitro* (Gazit, et al., 2013).

### **2.3 BMP4, TGF $\beta$ 1 y ácido retinoico como potenciales factores de diferenciación germinal**

El proceso de diferenciación de las MSC es controlado por mecanismos genéticos intrínsecos sujetos a señales extrínsecas del entorno, llamado nicho celular (Zhang y Li, 2005). Los miembros de la súper familia TGF $\beta$  son reguladores claves de la diferenciación y proliferación celular, necesarios para el desarrollo y reparación de los tejidos (Ingman y Robertson, 2007). Esta súper familia está integrada por más de 40 citoquinas que incluye activinas, inhibinas, proteínas morfogénica óseas (BMP), hormona anti-mülleriana, TGF $\beta$  (del 1 al 5), entre otros (Gálvez-Gastélum et al., 2004; Carlson, 2014). Los órganos y tejidos del tracto reproductivo están en una constante remodelación y desarrollo durante la pubertad y la vida adulta, y los miembros de la familia TGF $\beta$  contribuyen en la regulación molecular de dichos eventos reproductivos (Ingman y Robertson, 2002). TGF $\beta$ 1 es uno de los miembros más estudiado de esta familia, ya que comparte características estructurales y funcionales con otros miembros de su grupo, pero presenta diferencias en la unión al receptor y en las señales de transducción (Peralta-Zaragoza et al., 2001). TGF $\beta$ 1 es secretado en forma inactiva, pero los efectos biológicos los realiza la forma activa (Carlson, 2014). Su secuencia de aminoácidos en los mamíferos es altamente conservada y es idéntica en humanos, cerdos, vacas, monos y difiere en solo un aminoácido en ratones (Peralta-Zaragoza et al., 2001). Las proteínas SMAD (del inglés, small mother against decapentaplegic) son las principales encargadas de transmitir las señales TGF $\beta$ 1, mediando la señal desde el receptor en la membrana celular hasta los genes diana en el núcleo (Gálvez-Gastélum et al., 2004). Esta cascada de eventos comienza con la unión de TGF $\beta$ 1 a los receptores, los cuales se fosforilan y activan a las quinasas que activan a las proteínas R-SMAD, específicamente SMAD 2 y 3 (Carlson, 2014). Estas proteínas a su vez fosforiladas forman un complejo con Co-SMAD 4 y se trasladan a través del citoplasma hacia el núcleo donde regulan la transcripción de genes (Gálvez-

Gastélum et al., 2004). Estos genes llevan a cabo funciones biológicas de diferenciación, control del crecimiento, apoptosis celular y síntesis de matriz extracelular (Gálvez-Gastélum et al., 2004).

La actividad de las BMP fue observada por primera vez a mediados de la década de 1960 cuando se descubrió que podían inducir la formación de hueso de manera ectópica (Wang et al., 2014). Sin embargo, no fue hasta finales de 1980, cuando las primeras BMP se caracterizaron y se clonaron pudiendo ser estudiadas bioquímicamente (Wang et al., 2014). Desde su descubrimiento se ha demostrado su importancia en procesos fisiológicos más allá de la osteogénesis, como por ejemplo el mantenimiento de la homeostasis en el tejido adulto y la embriogénesis (Wang, et al., 2014). Existen más de veinte tipos de BMP, algunas de las cuales tienen funciones distintas mientras que otras tienen funciones superpuestas (Zhang y Li, 2005). Ha sido comprobado que las BMP son importantes para la regulación de las células madre tanto embrionarias como adultas, pero su función varía según el tipo de célula (Zhang y Li, 2005). Los dímeros de BMP se unen a los receptores tipo 1 (activin receptor-like kinase; ALK2, ALK3, o ALK6) y receptores tipo 2 (BMPR-II, ActR-IIA, or ActRIIB) y forman heterodímeros (de Sousa Lopes y McLaren, 2004). Esta unión activa a las proteínas R-SMAD (1, 5 y 8) que posteriormente se unen a Co-SMAD en una cascada de eventos que las transportan hasta el núcleo, donde inducen o reprimen la transcripción de los genes diana (Zhang y Li, 2005). BMP4 es un miembro de la súper familia TGF $\beta$ , que durante la embriogénesis es secretado por el ectodermo extraembrionario (ExE) y activa la expresión del gen Wnt3, que es el encargado principal de los eventos moleculares que controlan la gastrulación (Tortelote et al., 2013; Ufuk y Azim, 2016). BMP4 es secretada antes y durante la gastrulación y en respuesta a este estímulo, las células del epiblasto sintetizan los reguladores transcripcionales BLIMP1 y PRDM14 en un grupo de células las cuales adquieren propiedades de células germinales (Ying et al., 2001).

La función de la vitamina A en la producción de espermatozoides funcionales fue reportada hace casi un siglo (Hogarth y Griswold, 2013). Sin embargo, sólo años después se comprendió que el metabolito activo de la vitamina A, conocido como ácido retinoico, regula la espermatogénesis en las distintas etapas de diferenciación, incluyendo el inicio de la meiosis (Hogarth y Griswold, 2013). Los estudios realizados en ratones han demostrado que el AR parece ser sintetizado por las células de Sertoli en ciertos lugares a lo largo de los túbulos testiculares neonatales y que puede actuar de forma autocrina para generar *STRA8* (Stimulated by retinoic acid gene 8), que es un gen exclusivo de los vertebrados y que regula el inicio de la meiosis (Hogarth y Griswold, 2013; Koubova et al., 2014). Existen dos teorías sobre el efecto del AR sobre las espermatogonias y su distribución en el testículo. La primera menciona que todas las espermatogonias están preparadas para responder a la AR, pero su exposición es altamente regulada (Busada y Geyer, 2016). La segunda opción indica que todas las espermatogonias están expuestas al AR, pero sólo algunas pueden responder a este estímulo (Busada y Geyer, 2016). En la primera opción se contempla la presencia, en los gonocitos, de la enzima CYP26b1 que es específica de los machos y que degrada al AR (Trautmann et al., 2008; Bowles et al., 2006). Esta enzima impediría la acción del AR en los gonocitos, ya que de no hacerlo estos entrarían en meiosis precozmente y morirían por apoptosis (Trautmann et al., 2008). Los mecanismos celulares y moleculares del AR no están del todo definidos, pero se reconoce que este factor está involucrado en el cambio desde espermatogonias A indiferenciadas hacia espermatogonias A diferenciadas (Busada y Geyer., 2016).

## 2.4 Mecanismos de regulación de la línea celular germinal

El establecimiento de las células implicadas en la formación de los gametos requiere de procesos complejos de regulación durante el desarrollo embrionario y en la vida reproductiva adulta (Ramathal et al., 2016). Los espermatozoides son originados desde células precursoras adultas llamadas espermatogonias (SSC, del inglés Spermatogonial Stem Cell) que están localizadas en la periferia de los túbulos seminíferos rodeadas por las células de Sertoli (de Rooij y Grootegoed, 1998). El proceso de formación de los espermatozoides consta de fases secuenciales de proliferación y diferenciación celular (de Rooij y Grootegoed, 1998). Primero dan lugar a una extensa proliferación de espermatogonias creando un “pool” de reserva celular desde el cual se derivarán los espermatozoides luego de sucesivas divisiones mitóticas y meióticas (de Rooij y Grootegoed, 1998). Las espermatogonias son en general clasificadas como espermatogonias tipo A y B y las de tipo A pueden ser subclasificadas en otros tipos dependiendo de su disposición topográfica en la membrana basal (de Rooij y Grootegoed, 1998). En el modelo murino, las espermatogonias según su cercanía a la membrana basal son clasificadas como  $A_{\text{single}}$  (As),  $A_{\text{paired}}$  (Apr) y  $A_{\text{aligned}}$  (Aal), respectivamente (de Rooij y Grootegoed, 1998). Sin embargo, la denominación y clasificación de las células previas a la espermatogonia A1 pueden cambiar dependiendo de la especie. En el caso del bovino se ha sugerido una clasificación diferente para las espermatogonias tipo A, que han sido denominadas como BSC (basal stem cell), ASPC (agregated spermatogonial stem cell) y CSPC (committed spermatogonial precursor cell) (Wrobel et al., 1995). Las BSC son células pequeñas y redondas que contienen de uno a tres nucléolos irregulares y son comparables las espermatogonias As y Apr (Izadyar, et al., 2002). En el caso de las ASPC, su tamaño puede variar desde pequeñas a grandes, contienen uno o dos nucléolos y se asemejan a las espermatogonias Aal. Las CSPC son las espermatogonias de mayor tamaño que se encuentra en los testículos, tienen un gran nucléolo céntrico y son comparables a las espermatogonias diferenciadas (A1-A4) (Izadyar et al., 2002).

En los mamíferos, las SSC provienen de un linaje de células precursoras conocidas como células germinales primordiales (PGC) luego de la implantación y gastrulación embrionaria (de Sousa Lopes y McLaren, 2013). Las PGC derivan de la masa celular interna del blastocisto, específicamente de una estructura denominada epiblasto (Chuaire et al., 2002). Estudios embriológicos realizados en ratones se ha demostrado que las PGC provienen, en una etapa muy temprana de la embriogénesis (7,25 días post coitum, dpc) desde un grupo de aproximadamente 40 células que se encuentran en el mesodermo extraembrionario en la base del alantoides (Kurimoto et al., 2008). Durante la gastrulación, el proceso de especificación consiste en la designación de células del epiblasto hacia la línea germinal (De Felici, 2013).

La especificación es iniciada por el efecto de señales locales que se originan fuera del embrión. Estas señales están reguladas por BMP4 y BMP8b, que son secretadas por ExE y que actúan a través de la vía SMAD (De Felici, 2013). Posteriormente, las células del epiblasto responden a estas señales e inician la expresión de BLIMP1, conocido como "regulador maestro" de la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas (Saitou, 2009). BLIMP1 también está implicado en la diferenciación y mantenimiento de muchos linajes celulares distintos y últimamente se ha demostrado que marca el inicio del linaje de células germinales en el epiblasto (Saitou, 2009). BLIMP1 es fundamental en la especificación de las PGC y su ausencia resulta en una expresión aberrante de los marcadores específicos de las células germinales (Saitou, 2009). Las células BLIMP1 positivas aumentan en número y comienzan a moverse hacia el exterior del embrión a través de la línea primitiva embrionaria (De Felici, 2013). Casi al mismo tiempo, BMP4 induce la expresión de PRMD14, el cual marca la aparición o reclutamiento de los precursores de las PGC desde una población específica de células del epiblasto al igual que BLIMP1 (Hyttel et al., 2010; De Felici, 2013). PRDM14 junto con PRDM1 son responsables de la detención del programa

somático en las PGC y son los encargados de regular la readquisición de la pluripotencialidad (de Sousa Lopes y McLaren, 2013).

Mientras las PGC se especifican comienzan a expresar diversos genes específicos entre ellos se encuentra *FRAGILIS* que es un miembro de la familia de proteínas transmembrana inducibles que regula la adquisición de la función de célula germinal por parte de las células del epiblasto (Lacham-Kaplan, 2004). Su expresión se incrementa particularmente en el proceso de migración de las PGC e induce la expresión de otros genes como *STELLA*, que es una pequeña proteína nucleocitoplasmática que se expresa en una etapa temprana pre-implantación del embrión y en el ovocito después del parto (Lacham-Kaplan, 2004; Saitou y Yamaji, 2012). Además, las PGC expresan *OCT4* que tiene la función de regular la pluripotencialidad y la especificación de las PGC y es expresado en el epiblasto durante la gastrulación (Kehler et al., 2004).

Una vez especificadas, las PGC comienzan a migrar y se ubican en el alantoides para luego desplazarse hacia el endodermo embrionario adyacente (de Sousa Lopes y McLaren, 2013). Este movimiento activo está dirigido por factores quimiotácticos secretados por células somáticas, tales como el factor de crecimiento Kit/ligando o la quimiocina Cxcl12 que se unen a sus respectivos receptores (C-Kit y Cxcl14). Estos factores promueven la supervivencia durante la migración y también están implicados en la estimulación de la proliferación de las PGC (Rossitto et al., 2015). El lugar de destino de la migración de las PGC son las crestas genitales, donde estas células cambian a una forma redondeada, expresando E-cadherina y cesando su movimiento (de Sousa Lopes y McLaren, 2013). En este punto su expresión génica también cambia y comienzan a expresar *VASA*, que tiene la función de proliferación y diferenciación de las PGC (Lacham-Kaplan, 2004). Además, las PGC expresan *DAZL* que contribuye a la iniciación de la diferenciación específica del sexo en las células germinales tanto femeninas como masculinas (Rossitto et al., 2015). Su expresión se inicia durante

la migración de PGC y continúa durante el desarrollo de las células germinales (Lacham-Kaplan, 2004; Rossitto et al., 2015).

Después de llegar a las gónadas indiferenciadas bipotenciales, las PGC están expuestas a más señales somáticas que promuevan el desarrollo ya sea para un macho o una hembra (Carlson, 2014). En la gónada indiferenciada de un ratón XY, la determinación somática del sexo se induce a 10,5 dpc por la expresión del gen *SRY* ligado al cromosoma Y (Rossitto et al., 2015). En su punto máximo de expresión (11,5 dpc), *SRY* conduce a la expresión *SOX9* y la posterior diferenciación de los precursores de células somáticas hacia células de Sertoli (Rossitto et al., 2015). Tanto las células germinales XX como las XY se someten a varias rondas de mitosis, pero a partir del día 13,5 dpc su desarrollo comienza a diferenciarse ya que en el ovario las células germinales entran en la profase de la primera división meiótica mientras que, en el testículo su proliferación se reduce gradualmente hasta la detención final de la mitosis (Rossitto et al., 2015). Para iniciar la meiosis se requiere de manera intrínseca a *DAZL* y de manera extrínseca la señal de AR y su presencia genera la expresión de *STRA8* que promueve la entrada en la profase de la meiosis I, particularmente necesario para las células germinales femeninas (Rossitto et al., 2015). En cambio las células germinales masculinas no dependen del sexo cromosómico de las células germinales, sino de las señales del medio ambiente y de *NANOS2*, que bloquea la expresión de *STRA8* en los machos y de este modo evita la meiosis (Rossitto et al., 2015). Otros genes expresados en las PGC y en las células germinales pertenecen a la familia *PIWI*, *MIWI* y *MILI* y regulan la proliferación de las PGC y la espermatogénesis (Lacham-Kaplan, 2004).

Para lograr el proceso meiótico, los pares de cromosomas homólogos se emparejan por mecanismos que no están del todo claros, sin embargo, estos diferentes mecanismos de apareamiento culminan en el proceso de sinapsis, gracias al denominado complejo sinaptonémico (SC) (Page et al., 2004). El SC

es una estructura en forma de escalera compuesta en su mayor parte de proteínas específicas de meiosis (Fraune et al., 2012). Comienza su ensamblaje en una fase temprana, específicamente durante la profase I de la meiosis (Fraune et al., 2012). Los llamados elementos axiales (AE) se forman a lo largo de cada cromosoma durante el leptoteno y durante el zigoteno (Fraune et al., 2012). Los dos AE de los homólogos, ahora llamados elementos laterales (LE), se alinean estrechamente y se conectan firmemente en la región central que está compuesta de filamentos transversales (TF) y el elemento central (CE) (Fraune et al., 2012). El SC está completamente montado en paquíteno y su desmontaje comienza en diploteno (Fraune et al., 2012). Las proteínas 1, 2 y 3 son tres componentes específicos del SC en la meiosis de los mamíferos. La proteína del complejo sinaptonémico 1 (SCP1) es un componente principal de los filamentos transversales, mientras que las proteínas del complejo sinaptonémico 2 y 3 (SCP2 y SCP3) son componentes de los elementos axiales y laterales del SC (respectivamente) (Aarabi et al., 2006). SCP3 constituye el núcleo del complejo de elementos laterales y funciona como un marco molecular al que se unen otras proteínas. Tiene un papel en la regulación del ADN que se une al eje de la cromátida, la cohesión de las cromátidas hermanas, la sinapsis y la recombinación (Aarabi et al., 2006).

## **2.5 Diferenciación germinal en MSC y sus aplicaciones**

Como se ha demostrado en varios estudios, las MSC tienen un potencial muy flexible, pudiendo diferenciarse en células de múltiples linajes, como miosito derivado del mesodermo, hepatocitos derivados del endodermo y neurona de origen ectodérmico (Lee et al., 2007; Dueñas et al., 2014). La capacidad de las MSC para diferenciarse en células germinales ha sido evaluada en varias especies, generando expectativas sobre el uso de este tipo células para el tratamiento de enfermedades tanto humanas como animales (Nayernia et al., 2006; Hua et al., 2009; Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). Previamente se

ha reportado que las MSC-MO obtenidas de ratón tienen la capacidad de diferenciación hacia células germinales de macho bajo condiciones *in vitro* (Nayernia et al., 2006). Posteriormente, estas células fueron trasplantadas en túbulos seminíferos de animales receptores donde proliferaron, migraron hacia la membrana basal y colonizaron el epitelio seminífero (Nayernia et al., 2006). En forma similar, se han realizados ensayos utilizando MSC-MO aisladas de carneros que fueron expuestas a factores como BMP4, BMP8b y TGF $\beta$ 1, lo cual indujo un aumento en la expresión de genes marcadores de la línea celular germinal como *DAZL*, y *VASA* (Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014). Estos resultados sugieren que las MSC son potenciales candidatos para la producción *in vitro* de gametos (West et al., 2013). Los beneficios potenciales del estudio y desarrollo de esta tecnología en la reproducción animal serían de alto interés para la producción animal, como método para diseminación de material genético de elite mediante el trasplante de células germinales de macho obtenidas de MSC hacia animales receptores (Dobrinski, 2008). Además, puede ser utilizada en la producción de animales transgénicos, mediante manipulación genética de las células diferenciadas hacia la línea germinal y su posterior trasplante en individuos receptores (Dobrinski, 2008). Y por último como método de conservación de especies en peligro de extinción a través de la producción de gametos *in vitro* a partir de MSC.

### **3. HIPÓTESIS**

Las MSC-MO de origen fetal bovino poseen un amplio potencial de diferenciación celular *in vitro* que incluye principalmente linajes mesodérmicos. Por lo tanto, la suplementación de factores de diferenciación BMP4, TGF $\beta$ 1 y AR en un sistema de cultivo *in vitro* induce la diferenciación de MSC-MO fetales bovinas hacia linaje germinal.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la suplementación de BMP4, TGF $\beta$ 1 y AR como factores de diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO fetales bovinas.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de distintas concentraciones de BMP4, TGF $\beta$ 1 y AR sobre el potencial de diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO fetales bovinas.
2. Determinar el efecto de TGF $\beta$ 1, BMP4 y AR durante la diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO fetales bovinas.
3. Evaluar la expresión del marcador de meiosis *SCP3* durante la diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO fetales bovinas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención y aislamiento de MSC-MO fetales bovinas

Las MSC-MO se obtuvieron desde fetos bovinos (n=14) de 8 a 9 meses de gestación provenientes de una planta faenadora. Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico al Laboratorio Centralizado de Investigación en Ciencias Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los fémures fetales fueron separados de los tejidos blandos y seccionados en la diáfisis utilizando una sierra. Posteriormente se realizó una aspiración de la médula ósea mediante una aguja de 18 G conectada a una jeringa de 10 mL con medio de colección, consistente en DMEM alto en glucosa, sin glutamina y sin piruvato (GIBCO, Grand Island, USA), suplementado con 10000 µg/mL de estreptomina y 10000 UI/mL de penicilina (Corning, VA, USA) y 0,25 µg/mL de anfotericina B (Hyclone Laboratories, Utah, USA). Las MSC-MO fueron aisladas utilizando un protocolo descrito previamente (Bosnakovski et., 2005). A continuación, el aspirado de médula ósea fue centrifugado dos veces en PBS (del inglés; Phosphate-buffered saline) (pH 7,4; Hyclone Laboratories, Utah, USA) suplementado con 10000 µg/mL de estreptomina, 10000 UI/mL de penicilina y 0,25 µg/mL anfotericina B a 400g por 5 minutos. Por último, fue centrifugado dos veces en medio de colección o lavado consistente en DMEM (alto en glucosa sin glutamina y sin piruvato) suplementado con 10000 µg/mL de estreptomina, 10000 UI/mL de penicilina y 0,25 µg/mL anfotericina B a 400g por 5 minutos. Una vez lavado, el pellet fue aspirado y resuspendido en medio de expansión o de cultivo compuesto por DMEM alto en glucosa (sin glutamina y sin piruvato) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone Laboratories, Utah, USA), 0,25 µg/mL de anfotericina B, 10000 µg/mL de estreptomina y 10000 UI/mL de penicilina en placas de cultivo (T75, Falcon, New Jersey, USA) e incubadas a 38,5 °C bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de dos días las células no adheridas al plástico fueron removidas mediante el cambio de medio de cultivo. Para los experimentos

de diferenciación se utilizaron células de 3<sup>er</sup> o 4<sup>to</sup> pasaje. Las MSC-MO fueron despegadas mediante incubación con Tripsina/EDTA 1X (Hyclone Laboratories, Utah, USA) suplementada con 10000 µg/mL de estreptomicina, 10000 UI/mL de penicilina y 0,25 µg/mL de anfotericina B por 10 minutos a 38°C. El conteo de las MSC-MO fue realizado con una cámara de Neubauer, utilizando la tinción de Azul de Trypan para determinación de la proporción de células vivas.

## **5.2 Cultivo y diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO fetales bovinas**

Con el objetivo de determinar la concentración óptima (concentración que induce una mejor expresión de los genes germinales) de los factores de inducción germinal, las MSC-MO fueron sembradas en una concentración de  $5 \times 10^3$  en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, USA) en medio de expansión. En los ensayos dosis-respuesta, los cultivos de MSC-MO fueron suplementados con 0,01; 0,1 o 1 µM de AR (R2625; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1, 10 o 100 ng/mL de BMP4 recombinante humano (314-BP; R&D systems, Minneapolis, USA) o 1, 10 o 100 ng/mL de TGFβ1 recombinante humano (240-B; R&D systems, Minneapolis, USA) durante 21 días. El cambio de medio (suplementado con el factor inductor) fue realizado día por medio. Se utilizó una placa control por cada experimento suplementada con el vehículo de cada factor, 4mM HCl con 1mg/mL BSA en PBS para BMP4 y TGFβ1 y dimetilsulfóxido (DMSO, 31725; Calbiochem, CA, USA) para AR. Las MSC-MO fueron fotografiadas mediante microscopía de contraste de fase para evaluación de la morfología celular en cada uno de los experimentos en el día 7, 14 y 21. Se obtuvieron muestras celulares de los cultivos los días 0 y 21 de cultivo en el análisis de las concentraciones óptimas de los factores mediante cuantificación de la expresión de genes germinales y de pluripotencia mediante PCR cuantitativo (Q-PCR).

La concentración de BMP4, TGFβ1 y AR que indujo una mayor expresión de genes germinales fue utilizada para evaluar el efecto temporal del factor sobre la diferenciación germinal de MSC-MO. Las concentraciones utilizadas fueron 100 ng/mL de BMP4, 100 ng/mL de TGFβ1 y 0,1 μM de AR. Para este experimento, las MSC-MO fueron sembradas en una concentración de  $5 \times 10^3$  en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, USA) con medio de cultivo más las concentraciones óptimas de los factores durante 21 días. El medio de cultivo fue cambiado día por medio y se colectaron muestras los días 0, 7, 14 y 21 de diferenciación para la cuantificación de la expresión de genes germinales y de pluripotencia mediante Q-PCR. Además, se obtuvieron muestras celulares los días 0 y 21 de cultivo para análisis de genes germinales y de pluripotencia mediante citometría de flujo. Se realizaron 3 repeticiones por experimento.

Para la realización de Q-PCR las muestras de células fueron fijadas en buffer lisis (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) con 20 μL de β-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Mientras que para la realización de la citometría de flujo las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído (PFA) con PBS 1x durante 15 minutos a 4 °C y luego lavadas y conservadas con PBS 1x.

### **5.3 Cuantificación de niveles de mRNA de genes germinales en MSC-MO fetales bovinas mediante PCR cuantitativo (Q-PCR)**

Se realizó la cuantificación de los niveles de mRNA mediante Q-PCR, de los genes endógenos *GAPDH* y *β-ACTINA*, genes de pluripotencialidad *OCT4* y *NANOG*, genes germinales *FRAGILIS*, *STELLA*, *VASA* y genes germinales de macho *DAZL*, *PIWIL2*, *STRA8* y el marcador de meiosis *SCP3* (Tabla 1). El RNA total fue extraído desde las células utilizando un kit GeneJet RNA purification

(Thermo Fisher Scientific, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA total fue cuantificado utilizando un Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher, CA, USA). Para la remoción del DNA genómico se utilizó un kit DNase I (Thermo Scientific, MA, USA). El cDNA fue sintetizado y amplificado mediante un kit Affinity Script Q-PCR cDNA Synthesis (Agilent Technologies, CA, USA), utilizando un termociclador TC1000-G (SciLogex, CT, USA). La reacción de PCR fue realizada utilizando un kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, CA, USA) y un termociclador Eco Real-Time PCR System (Illumina, CA, USA). Se utilizaron microplacas ECOPLATE 48 (Bibby Scientific, ST, UK) y cada posillo de reacción consistió en 5  $\mu$ L de Sybr Green, 1  $\mu$ L de partidor Forward, 1  $\mu$ L de partidor Reverse, 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 5 ng de cDNA. La amplificación del cDNA se extendió por 40 ciclos durante 30 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. El análisis de expresión relativa se realizó utilizando el método  $\Delta\Delta$ Ct.

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

<b>Gen</b>	<b>Secuencia Nucleotídica (5'-3')</b>	<b>N° Acceso</b>
<b>Genes endógenos</b>		
<i>GAPDH</i>	Forward CCTTCATTGACCTTCACTACATGG TCTA	NM_001034034.2
	Reverse TGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	
<i>β- ACTINA</i>	Forward CGCACCACTGGCATTGTCAT	NM_173979.3
	Reverse TCCAAGGCGACGTAGCAGAG	
<b>Genes de pluripotencia</b>		
<i>OCT4</i>	Forward GAAAGAGAAAGCGGACGAG	NM_174580.2
	Reverse GTGAAAGGAGACCCAGCAG	
<i>NANOG</i>	Forward TAAGCACAGGGGGCAAAGT	NM_001025344.1
	Reverse ATGGCTAAAAGGGGTGGAGG	
<b>Genes germinales</b>		
<i>FRAGILIS</i>	Forward ATCTGCAGCGAGACCTCTGT	XM_002697323
	Reverse CCGATGGACATGATGATGAG	
<i>STELLA</i>	Forward TGCAAGTTGCCACTCAACTC	NM_001111110
	Reverse TCTTACCCCTCTCCGCCTAT	
<i>VASA</i>	Forward TGCTACTCCTGGAAGACTGA	JX437185.1
	Reverse CGGTCTGCTGAACATCTCTA	
<b>Genes germinales de macho</b>		
<i>DAZL</i>	Forward TCCAAGTTCACCAGTTCAGG	NM_001081725.1
	Reverse CGTCTGTATGCTTCTGTCCAC	
<i>PIWIL2</i>	Forward TCGTATTGATGATGTGGATTGG	XM_617223.3
	Reverse GGGAGCAGCAGGATTTAC	
<i>STRA8</i>	Forward TGTGCCAGGTGTTTCATCTC	XM_015463130
	Reverse GGGACTGTCACCTCATTGG	
<b>Gen marcador de meiosis</b>		
<i>SCP3</i>	Forward GCTGGAAAGATT TGGAGCTG	BC102433
	Reverse ATCCCACTGCTGGAACAAAG	

## **5.4 Análisis de marcadores germinales y de pluripotencia en MSC-MO fetales bovinas mediante citometría de flujo**

La determinación de la población de MSC-MO positiva a la expresión de los marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4 y germinal Dazl, se realizó mediante citometría de flujo. Las células fueron removidas desde las placas de cultivo utilizando EDTA (3 mL) durante 10 - 20 minutos a 38 °C, Tripsina 1x que fue posteriormente inactivada con medio de cultivo (3 mL). Las MSC-MO fueron centrifugadas a 400g por 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Las MSC-MO fueron lavadas con PBS y nuevamente centrifugadas a 400g por 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Posteriormente las MSC-MO fueron fijadas con paraformaldeído 4% (PFA) e incubadas por 15 minutos a 4 °C para finalmente ser lavadas con PBS. Luego fueron re-suspendidas en solución permeabilizante (Tritón 1% en PBS) entre 5-10 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 3000 rpm para luego eliminar el sobrenadante y ser re-suspendidas en solución de lavado (0,1% Tween en PBS). Después de ser lavadas, las MSC-MO fueron incubadas en una solución de bloqueo (3% albúmina sérica bovina y 1,5 mg/mL glicina en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las MSC-MO fueron incubadas con el anticuerpo primarios policlonal de conejo anti-Dazl reactivo a bovino (ab-34139; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-Oct4 o anti-Nanog de cabra (sc-8628 y sc-30331; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) respectivamente. Los anticuerpos fueron diluidos en 3% de albúmina sérica bovina diluido en PBS en una proporción 1:50 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las MSC-MO fueron lavados tres veces en 0,1% Tween en PBS y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e incubadas en anticuerpo secundario IgG de conejo anti-cabra conjugado con FITC (A11078; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) o IgG de burro anti-cabra conjugado con FITC (ab-97050; Abcam) diluido en 3% de albúmina sérica bovina en PBS en una proporción 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados, el pellet fue re-suspendido en 0,1% Tween en PBS con 2 µL de yoduro de propidio

(L7011, Invitrogen, OR, USA) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron centrifugadas con solución de lavado y re-suspendidas en buffer para citometría IsoFlow Sheath Fluid (Beckman Coulter, CA, USA) para ser analizadas en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, CA, USA).

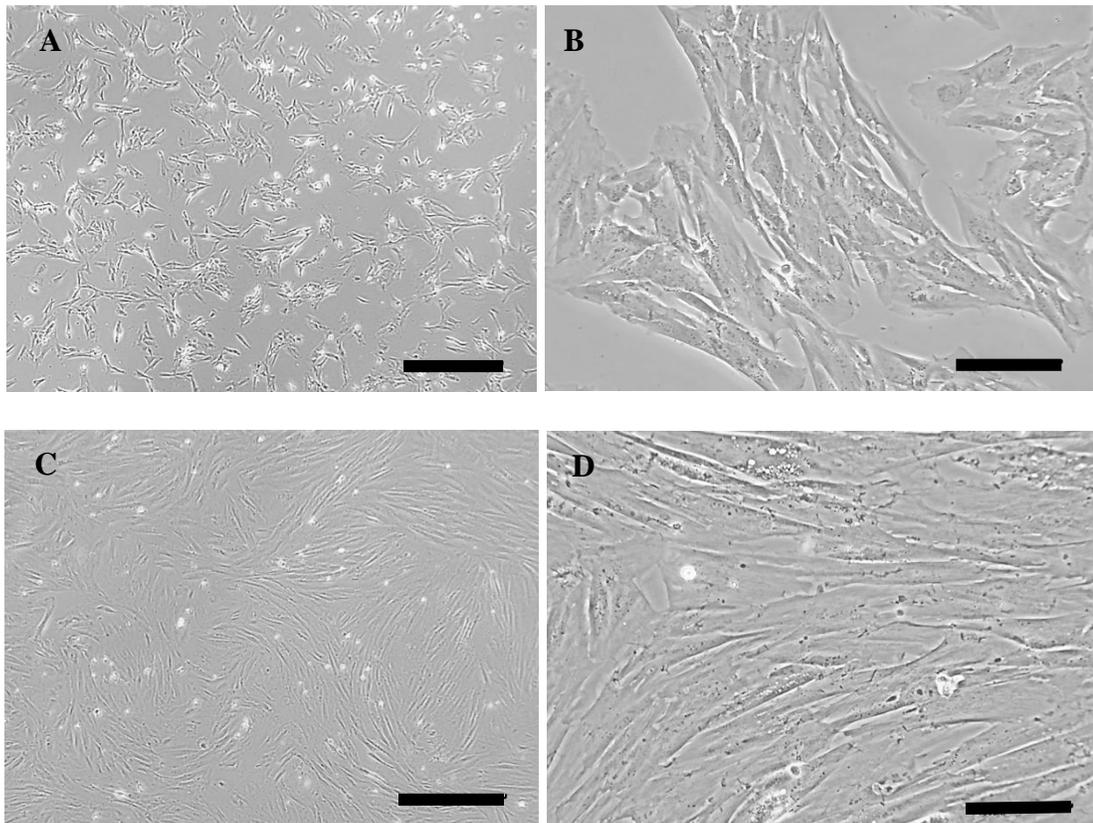
## **5.5 Análisis estadístico**

Los datos de expresión génica obtenidos desde tres repeticiones fueron expresados como media y desviación estándar. La normalidad de los datos fue evaluada mediante prueba de Shapiro Wilks (modificado). El modelo estadístico consideró como variable dependientes los niveles de mRNA y el porcentaje de células positivas a los marcadores, en tanto que como variables independientes fueron consideradas los días en cultivo, la presencia y/o concentración de los factores de diferenciación y la interacción entre ambas variables. Se utilizó un valor de significancia de  $P < 0,05$ . Los valores de expresión relativa de los genes fueron analizados por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios para días de cultivo y tratamientos fueron determinadas utilizando el Test LSD de Fisher. Todos los análisis estadísticos fueron utilizando el software Info Stat (Cordoba, Argentina).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento y cultivo de MSC-MO fetales bovinas

Las MSC-MO fueron aisladas desde médula ósea fetal bovina, en base a su capacidad de adherencia a la superficie plástica del frasco de cultivo. Las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante sucesivos cambios de medio de cultivo. Posteriormente las MSC-MO fueron cultivadas en monocapa, expandidas mediante pasajes y caracterizadas por su morfología (Figura 1). Las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 80 a 90% donde presentaron principalmente una morfología fibroblastoide.



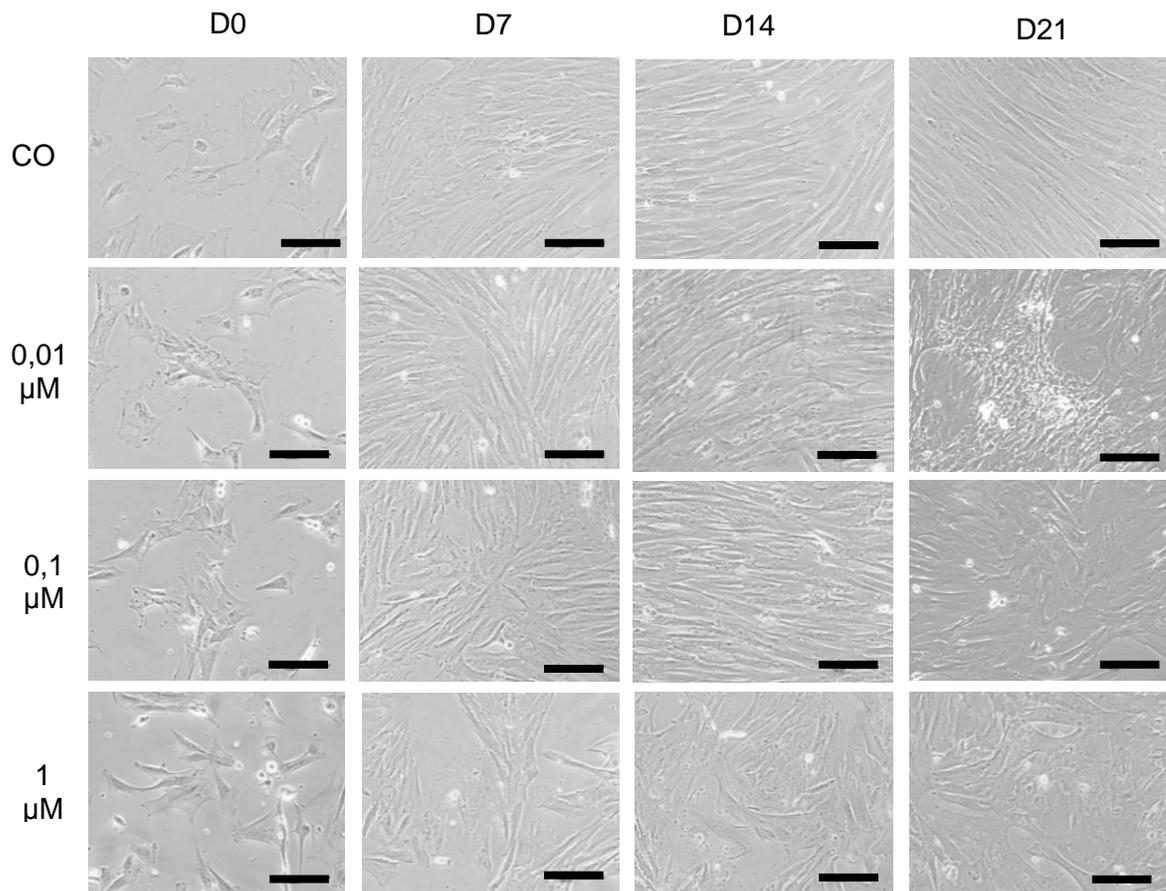
**Figura 1.** MSC-MO fetales bovinas adheridas al plástico en condiciones estándares de cultivo. Microfotografía de contraste de fase. Las MSC-MO cultivadas en monocapa demostrando su característica morfología fibroblastoide. Barra de escala (A y C) 500 µm, (B y D) 100 µm.

## **6.2 Determinación del efecto de AR sobre la diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas**

Las MSC-MO fetales bovinas de 3<sup>er</sup> o 4<sup>to</sup> pasaje fueron sembradas a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup> y suplementadas con AR, con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición este factor en la morfología, expresión de marcadores de pluripotencia y germinales de las MSC-MO fetales bovinas durante la diferenciación germinal *in vitro*.

### **6.2.1 Efecto dosis-respuesta del AR sobre la morfología de MSC-MO fetales bovinas**

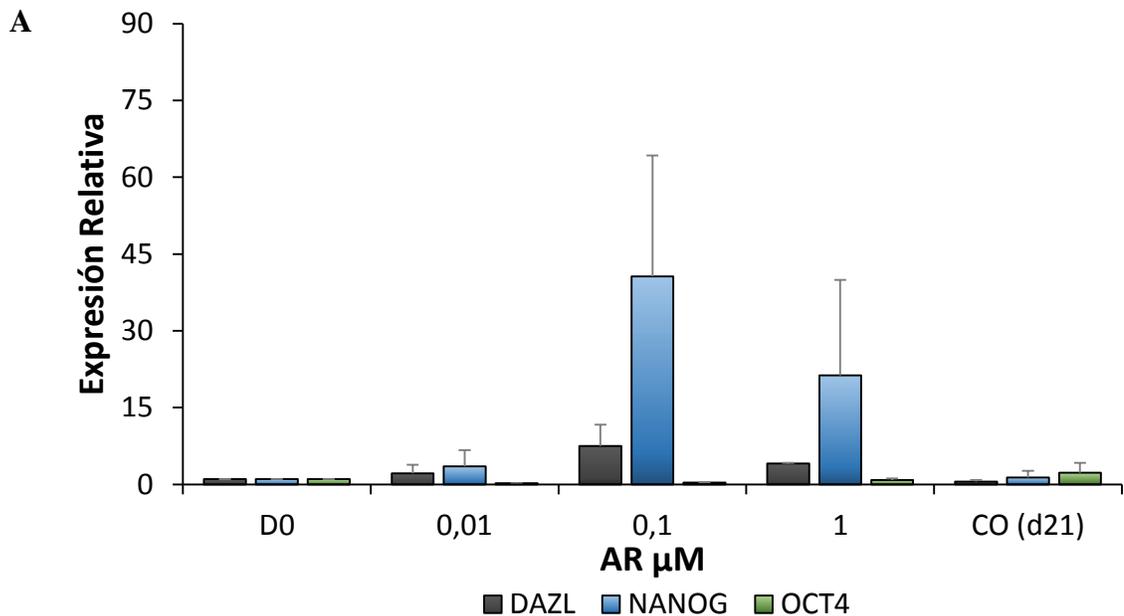
Las MSC-MO fetales bovinas expuestas a tres concentraciones distintas de AR durante un período de 21 días de cultivo presentaron cambios morfológicos caracterizados por el desarrollo de diversas prolongaciones celulares, en una distribución desorganizada y aleatoria en el frasco de cultivo. Desde el día 7 de cultivo, fue posible observar una menor confluencia celular en cultivos expuestos a las concentraciones alta y media de AR en comparación con el cultivo control no tratado. Las MSC-MO fetales bovinas expuestas a la dosis más alta de AR (1  $\mu\text{M}$ ), presentaron una morfología poligonal con elongaciones citoplasmáticas más pronunciadas en comparación con las células tratadas con concentraciones media (0,1  $\mu\text{M}$ ) y baja (0,01  $\mu\text{M}$ ) de AR. Al final del periodo de cultivo la morfología de las MSC-MO expuestas a AR fue distinta a los cultivos controles no tratados los cuales se caracterizaron por poseer una forma fibroblástica y distribución lineal en paralelo (Figura 2).

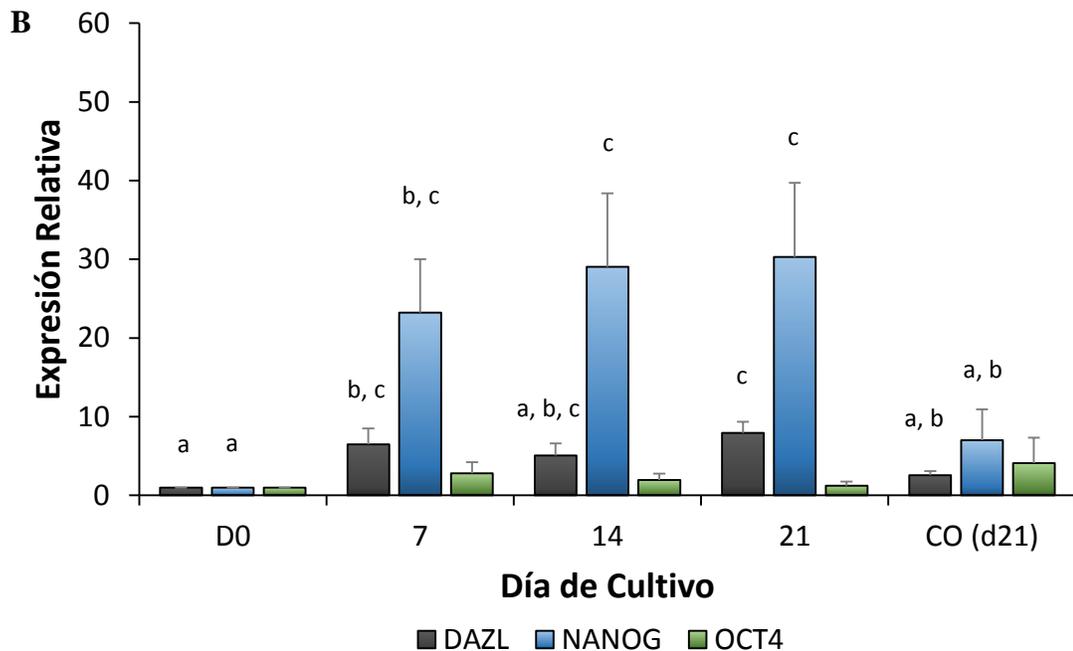


**Figura 2.** Cambios morfológicos de MSC-MO fetales bovinas durante el tratamiento con tres concentraciones diferentes de AR. Microfotografía de contraste de fase. MSC-MO expuestas a la dosis más alta de AR (1  $\mu\text{M}$ ) presentaron una menor confluencia el día 7 y una morfología poligonal con elongaciones citoplasmáticas más pronunciadas los días 14 y 21 en comparación con las MSC-MO tratadas con concentraciones media y baja de AR. Microfotografía de contraste de fase. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Abreviación: CO, control; D0, día 0.

## 6.2.2 Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y germinales en MSC-MO fetales bovinas expuestas a AR

En la diferenciación germinal de MSC-MO suplementadas con AR, se tomaron muestras de día 0 y, posteriormente, desde cultivos no tratados y tratados con 0,01, 0,1 y 1  $\mu\text{M}$  de AR en el día 21. El análisis de los niveles de mRNA de *DAZL*, *OCT4* y *NANOG* no detectó diferencias ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos para las concentraciones en los días analizados (Figura 3A). Para el análisis del efecto temporal de AR, las MSC-MO fueron expuestas a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  durante 21 días de cultivo. La concentración 0,1  $\mu\text{M}$  fue elegida debido a que indujo una alta expresión de *DAZL* y se observaron una baja proporción de células flotantes visibles mediante microscopía de contraste. Las muestras para el análisis de Q-PCR fueron colectadas los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo. Se detectó un aumento ( $P < 0,05$ ) en los niveles de expresión de *DAZL* en los días 7 y 21 de inducción (6,4 y 7,9 veces la expresión del día 0, respectivamente) (Figura 3B). Los niveles de mRNA de *NANOG* aumentaron ( $P < 0,05$ ) a partir del día 7 (23,2 veces) hasta el día 21 de inducción (30,3 veces) en comparación con el día 0 y el control. No se detectaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en los niveles de expresión de mRNA de *OCT4* en MSC-MO tratadas con 0,1  $\mu\text{M}$  de AR.



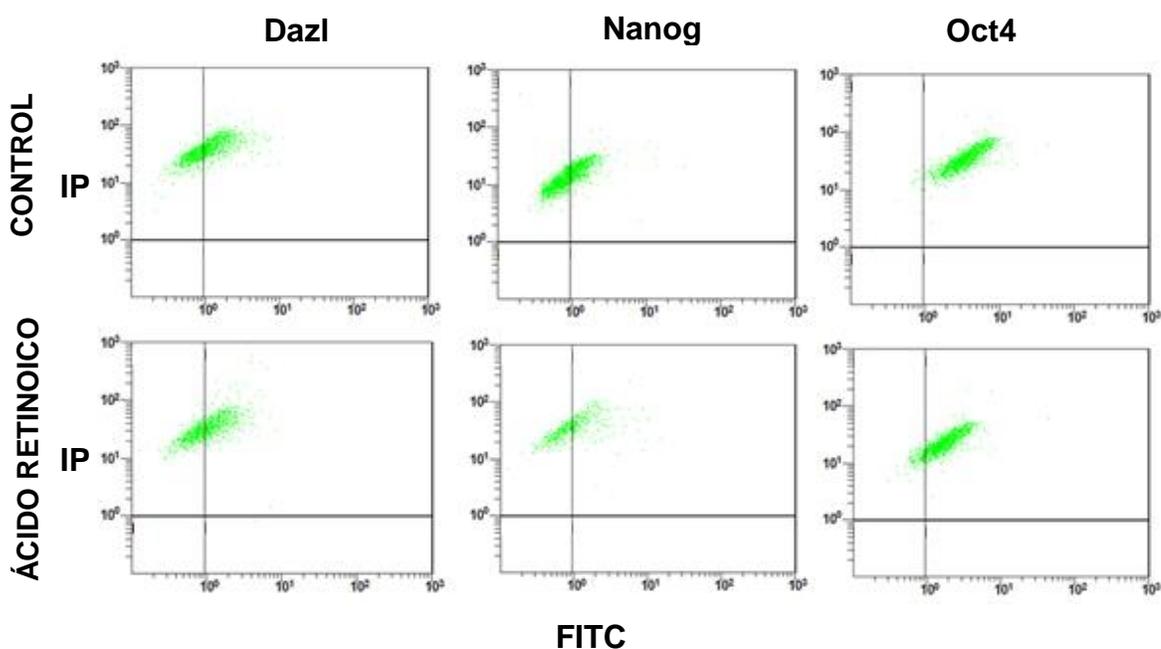


**Figura 3.** Expresión de los genes *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* en MSC-MO fetales bovinas tratadas con AR. En el análisis dosis-respuesta (A), no se detectaron diferencias ( $P>0,05$ ) en los niveles de mRNA de *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* entre los tratamientos. En el análisis temporal (B), las MSC-MO suplementadas con  $0,1 \mu\text{M}$  aumentaron ( $P<0,05$ ) la expresión de *DAZL* a partir del día 7 hasta el 21 de diferenciación. La expresión de *NANOG* aumentó ( $P<0,05$ ) desde el día 7 hasta el día 21. No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en la expresión de *OCT4*. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas entre días de cultivo.  $n=3$  (ANOVA). Abreviación: CO, control; D0, día 0.

### 6.2.3 Expresión de los marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO fetales bovinas expuestas a AR

Las MSC-MO cultivadas por un período de 21 días en presencia de una concentración de  $0,1 \mu\text{M}$  de AR fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinación de la expresión del marcador germinal *Dazl* y los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Nanog*. Las muestras fueron colectadas los días 0 y 21 de inducción, desde cultivos tratados con AR y los cultivos controles. Como cultivo control se utilizaron MSC-MO fetales bovinas suplementadas con DMSO

(10  $\mu$ L). En las muestras analizadas una mayor proporción ( $P < 0,05$ ) de MSC-MO fueron positivas a Dazl ( $69,5\% \pm 6,1$ ) en el cultivo suplementado con AR en relación con el grupo control ( $57,3\% \pm 0,2$ ). En el análisis de Nanog no se detectaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en las MSC-MO del cultivo control y las suplementadas con AR. Sin embargo, una mayor proporción ( $P < 0,05$ ) de MSC-MO fue positiva a Oct4 en el grupo control ( $99,4\% \pm 0,4$ ) en comparación con las MSC-MO tratadas con AR ( $83,2\% \pm 3,5$ ) al final del periodo de cultivo de 21 días.



Proteína	Control (%)	AR (%)
Dazl	$57,3 \pm 0,2^a$	$69,5 \pm 6,1^b$
Nanog	$38,1 \pm 4,0$	$41,4 \pm 2,5$
Oct4	$99,4 \pm 0,4^a$	$83,2 \pm 3,5^b$

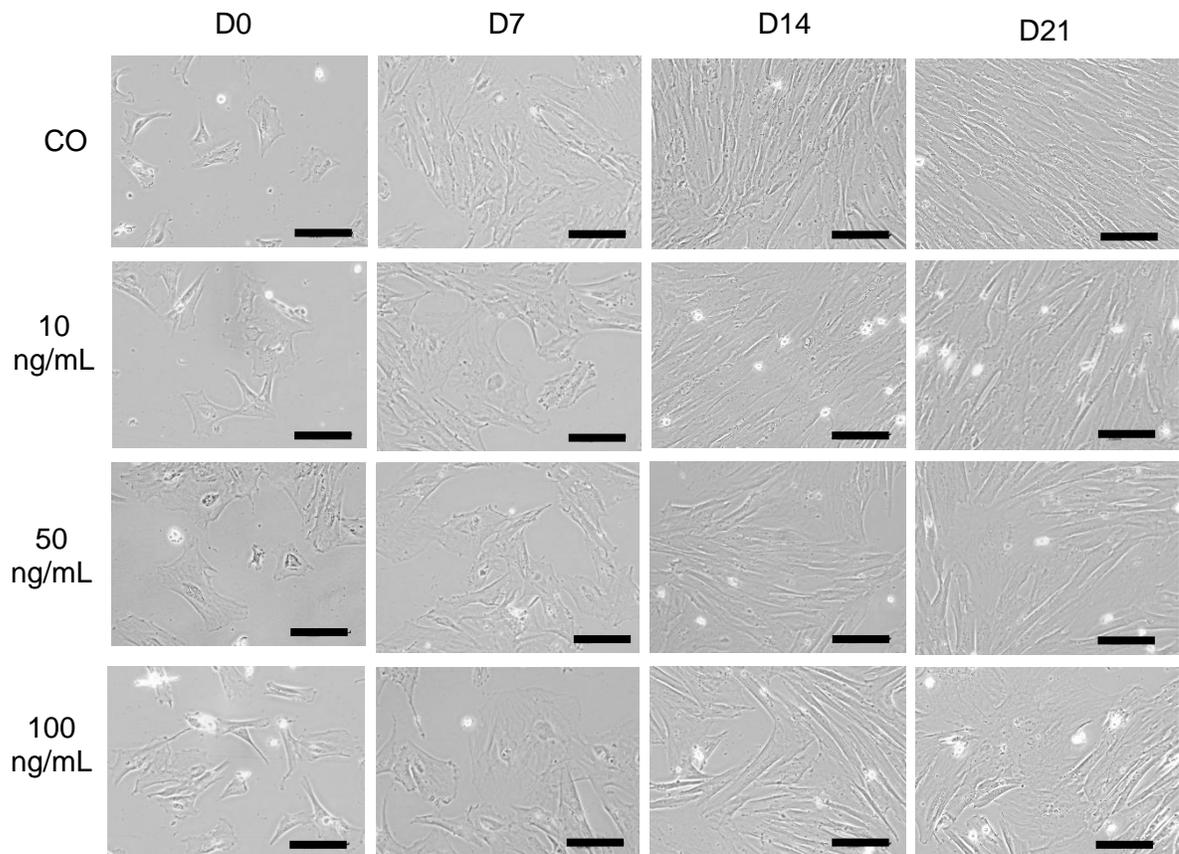
**Figura 4.** Aumento de la expresión del marcador germinal (Dazl) y disminución del marcador de pluripotencia Oct4 en MSC-MO fetales bovinas tratadas con AR. Citometría de flujo (Dotplot). Una mayor proporción ( $P < 0,05$ ) de MSC-MO expresaron Dazl luego de ser expuestas a  $0,1 \mu\text{M}$  de AR en comparación con el vehículo luego de 21 días de cultivo. Una mayor ( $P < 0,05$ ) proporción de MSC-MO del cultivo control expresaron Oct4 en relación a las MSC-MO suplementadas con AR. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre cultivos. Abreviación: IP, yoduro de propidio.

### **6.3 Determinación del efecto de BMP4 sobre la diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas**

Las MSC-MO fetales bovinas de 3<sup>er</sup> o 4<sup>to</sup> pasaje fueron sembradas a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup> y suplementadas con BMP4, con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición este factor en la morfología, expresión de marcadores de pluripotencia y germinales de las MSC-MO fetales bovinas durante la diferenciación germinal.

#### **6.3.1 Efecto dosis-respuesta de BMP4 sobre la morfología celular de MSC-MO fetales bovinas**

Las MSC-MO fueron expuestas por 21 días a tres concentraciones de BMP4 (10, 50, y 100 ng/mL) y como control se utilizaron MSC-MO expuestas al vehículo (4mM HCl con 1mg/mL BSA). Durante este periodo de cultivo, las MSC-MO fueron fotografiadas los días 0, 7, 14 y 21. Las MSC-MO tratadas con la concentración más alta de BMP4 (100 ng/mL) presentaron una morfología poligonal con gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas en comparación con el control no tratado (Figura 5). Al finalizar el período de cultivo se pudo observar que las MSC-MO del cultivo control presentaron una forma típicamente fibroblastoide y mayor confluencia celular a partir del día 14 y hasta el día 21.



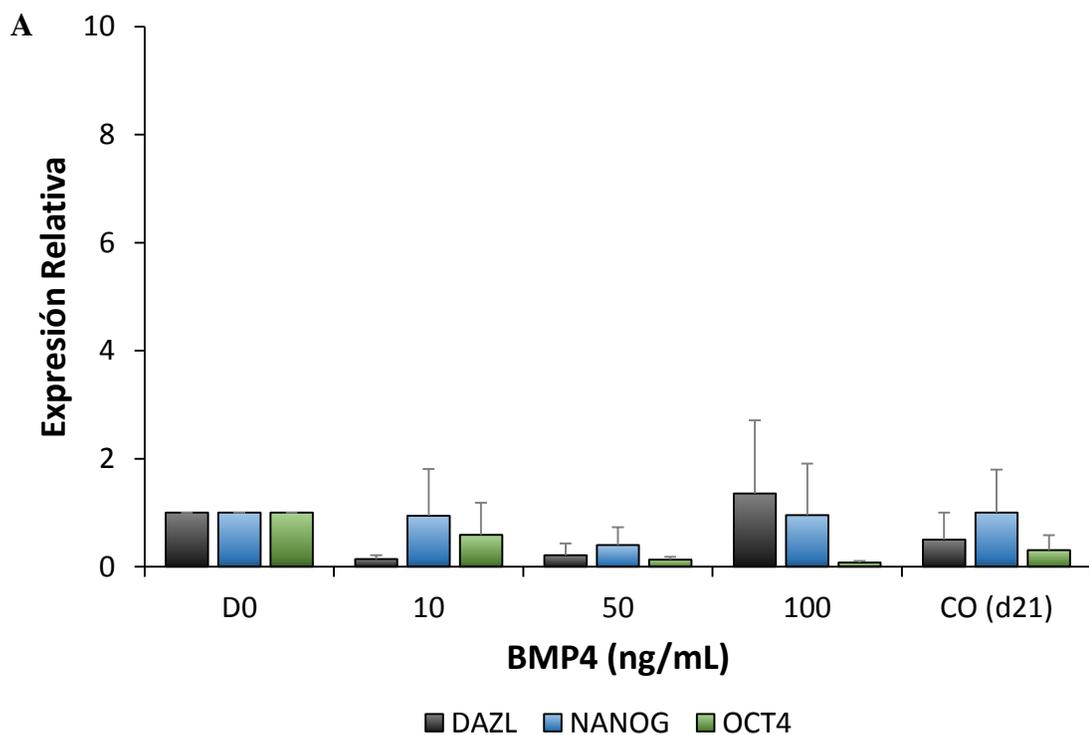
**Figura 5.** Cambios morfológicos de MSC-MO durante el tratamiento con tres concentraciones diferentes de BMP4. Microfotografía de contraste de fase. Las MSC-MO tratadas con 100 ng/mL de BMP4 presentaron una morfología poligonal con gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas en comparación con el cultivo control no tratado. Microfotografía de contraste de fase. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Abreviación: CO, control; D0, día 0.

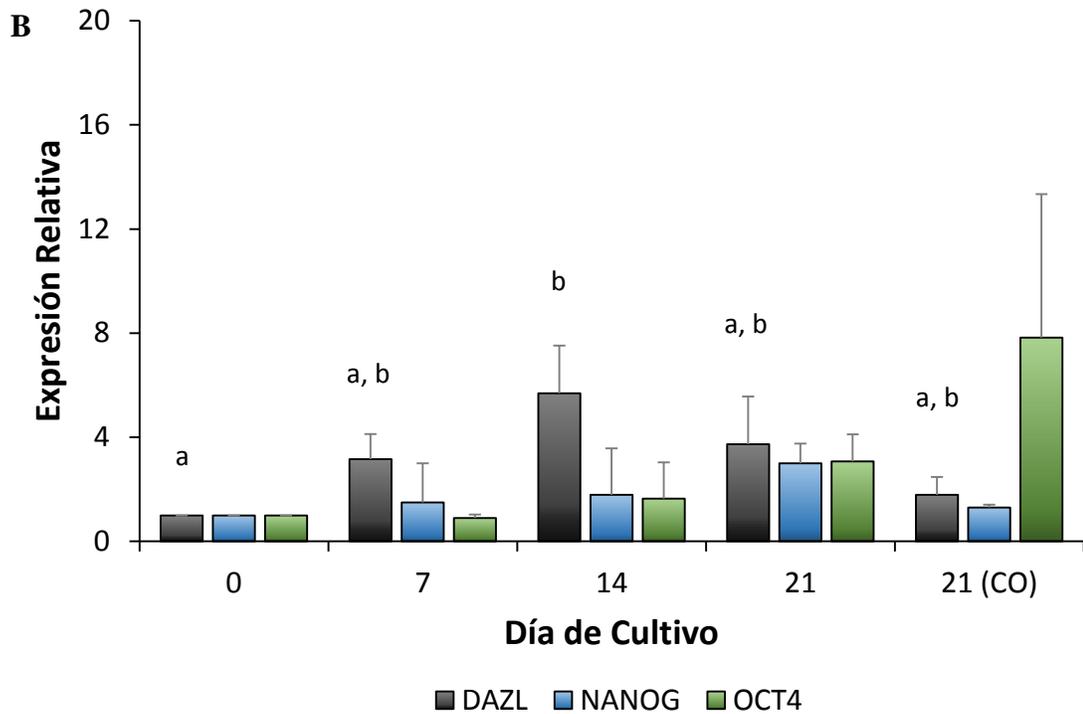
### 6.3.2 Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y germinales en MSC-MO fetales bovinas expuestas a BMP4

El efecto de BMP4 fue evaluado en distintas concentraciones y durante la diferenciación germinal en MSC-MO fetales bovinas. Para el análisis del efecto dosis-respuesta, las muestras fueron obtenidas el día 0 y desde cultivos tratados con el vehículo como control y desde cultivos tratados con 1, 10 o 100 ng/mL de

BMP4, el día 21 de cultivo. No se detectaron diferencias ( $P>0,05$ ) en los niveles de mRNA de *DAZL*, *OCT4* y *NANOG*, entre células expuestas a distintas concentraciones de BMP4 (Figura 6A).

En el análisis del efecto temporal de BMP4, se cuantificaron los niveles de mRNA de los genes de *NANOG*, *OCT4* y *DAZL* durante el cultivo por 21 días. A pesar de no encontrar diferencias en cuanto a expresión génica en MSC-MO expuestas a las distintas concentraciones de BMP4, para el análisis temporal las células fueron suplementadas con 100 ng/mL de BMP4 con el objetivo de inducir un mayor efecto sobre la expresión de genes germinales. Las muestras fueron obtenidas desde los cultivos los días 0, 7, 14 y 21 y desde el cultivo control el día 21. Se detectó un aumento ( $P<0,05$ ) en los niveles de mRNA de *DAZL* en las MSC-MO a partir del día 14 con una expresión 5,6 veces comparada con la del día 0 (Figura 6B). Al cuantificar la expresión de *NANOG* y *OCT4* no se detectaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre los días de cultivo.



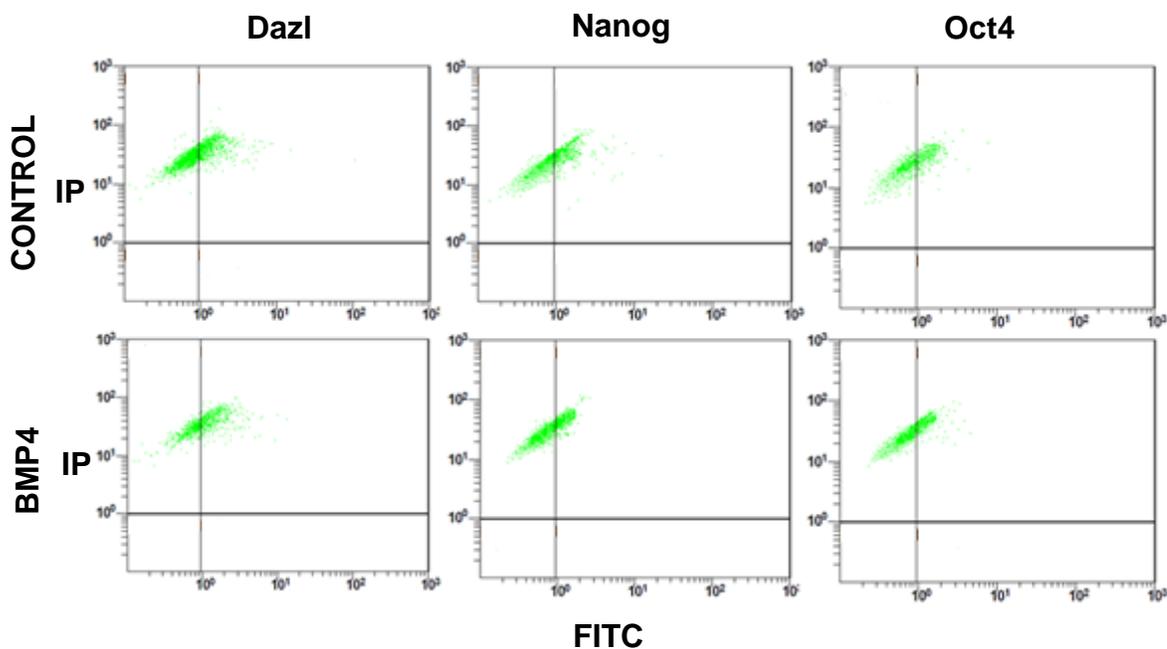


**Figura 6.** Expresión de los genes *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* en MSC-MO fetales bovinas tratadas con BMP4. En el análisis dosis-respuesta (A), no se detectaron diferencias ( $P>0,05$ ) en los niveles de mRNA de *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* entre los tratamientos. En el análisis temporal (B), se detectó efecto transitorio en los niveles de mRNA de *DAZL*, con un aumento significativo ( $P<0,05$ ) en el día 14 de diferenciación. No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en la expresión de *NANOG* y *OCT4*. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas entre días de cultivo.  $n= 3$  (ANOVA). Abreviación: CO, control; D0, día 0.

### 6.3.3 Expresión de marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO expuestas a BMP4

Las MSC-MO fueron cultivadas durante 21 días utilizando una concentración de 100 ng/mL de BMP4 para el análisis de expresión de las proteínas Dazl, Oct4 y Nanog mediante citometría de flujo. Se colectaron muestras en el día 21 desde cultivos tratados con 100 ng/mL de BMP4 y desde cultivos controles tratados con

10  $\mu$ L del vehículo. Los porcentajes de MSC-MO positivas a Dazl, Nanog y Oct4 no fueron distintos ( $P>0,05$ ) entre cultivo suplementado con BMP4 y cultivo controles al día 21.



Proteína	Control (%)	BMP4 (%)
Dazl	56,9 $\pm$ 0,2	56,9 $\pm$ 0,7
Nanog	37,2 $\pm$ 11,3	40,2 $\pm$ 8,0
Oct4	38,7 $\pm$ 7,9	40,2 $\pm$ 7,2

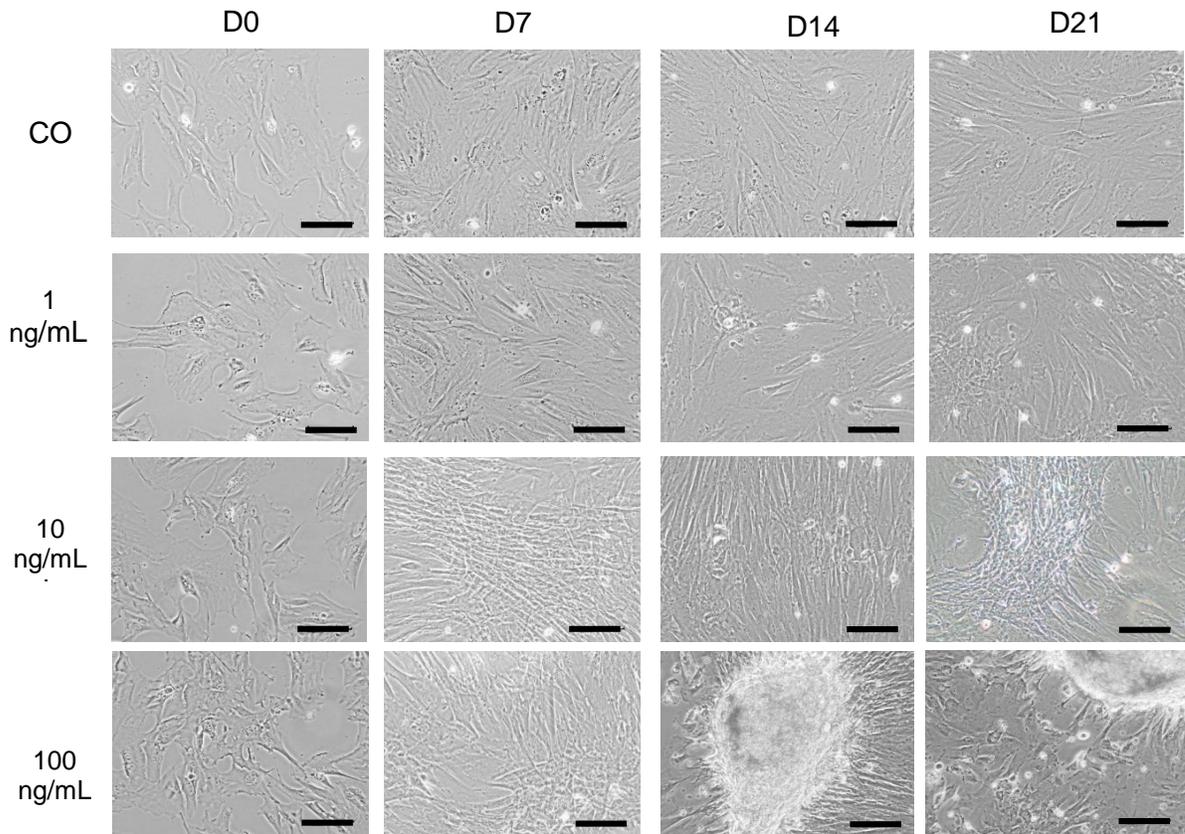
**Figura 7.** Expresión del marcador germinal (Dazl) y de pluripotencia (Nanog y Oct4) mediante citometría de flujo (Dotplot) en MSC-MO fetales bovinas tratadas con BMP4. No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en el porcentaje de MSC-MO positivas a Dazl, Nanog y Oct4 en las células suplementadas con BMP4 y los cultivos controles. Abreviación: IP, yoduro de propidio.

## **6.4 Determinación del efecto de TGFβ1 en la diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas**

Las MSC-MO fetales bovinas de 3<sup>er</sup> pasaje fueron sembradas a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup> y suplementadas con TGFβ1, con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición este factor en la morfología, expresión de marcadores de pluripotencia y germinales de las MSC-MO fetales bovinas durante la diferenciación germinal.

### **6.4.1 Efecto dosis-respuesta de TGFβ1 sobre la morfología celular de MSC-MO fetales bovinas**

Las MSC-MO fetales bovinas fueron cultivadas durante 21 días en presencia de tres concentraciones de TGFβ1 (1; 10 y 100 ng/mL). Como cultivo control se utilizaron MSC-MO que fueron tratadas con el vehículo (4mM HCl con 1mg/mL BSA). Las MSC-MO fueron fotografiadas los días 0, 7, 14 y 21. Se observó la presencia de agregados celulares en los cultivos de MSC-MO expuestos a TGFβ1. Un mayor número de estos agregados fueron visibles en el día 21 en las MSC-MO tratadas con 100 ng/mL y, no fueron observados estos agregados en el cultivo control. Además, fue posible identificar un mayor tamaño y número de agregados en cultivos de MSC-MO expuestos a las dosis más altas.

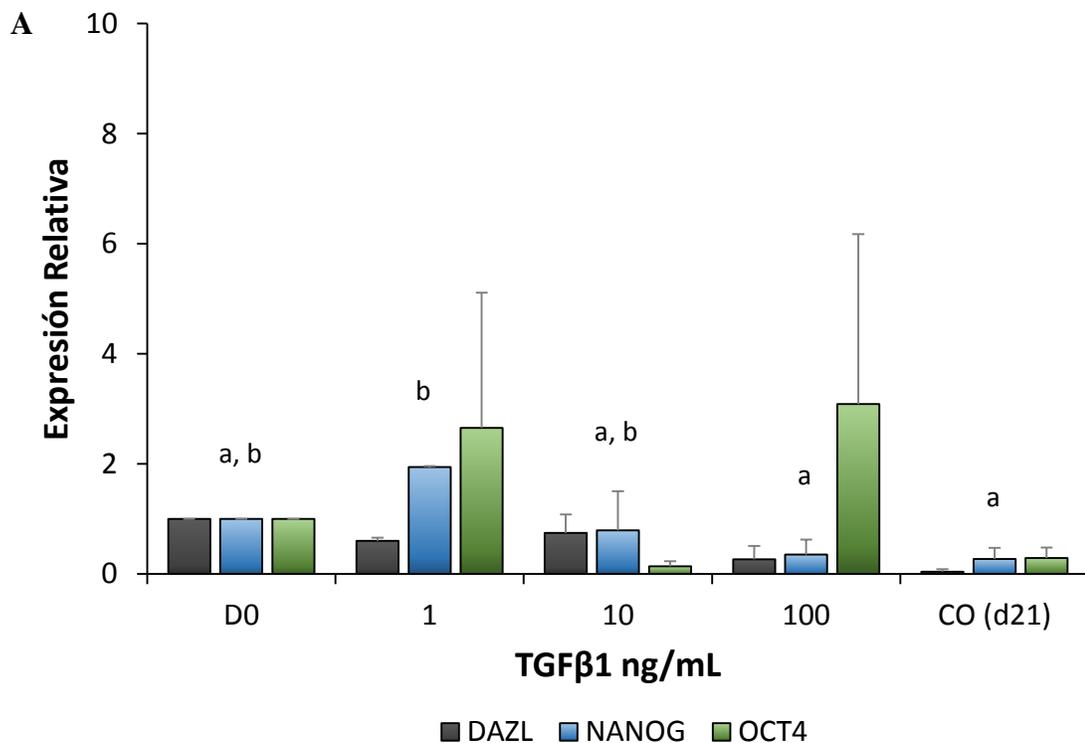


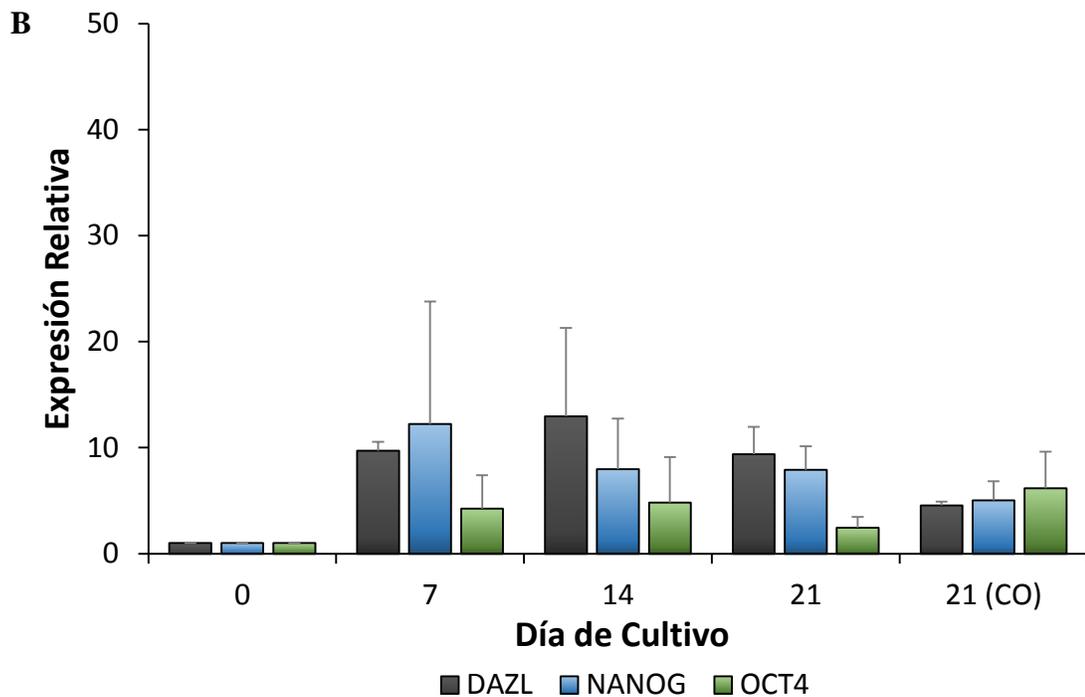
**Figura 8.** Cambios morfológicos de MSC-MO después del tratamiento con tres concentraciones diferentes de TGF $\beta$ 1. Presencia de numerosos agregados celulares visibles a partir del día 14 en las células tratadas con 100 ng/mL. No se observaron agregados celulares en el cultivo control no tratado. Microfotografía de contraste de fase. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Abreviación: CO, control; DO, día 0.

#### **6.4.2 Niveles de mRNA de genes de pluripotencia y germinales en MSC-MO fetales bovinas expuestas a TGF $\beta$ 1**

Para el análisis de los genes de pluripotencia y germinales como representación del potencial de diferenciación germinal de MSC-MO, se obtuvieron muestras el día 0, el día 21 en los cultivos celulares tratados con tres concentraciones de TGF $\beta$ 1 (1 ng/mL, 10 ng/mL y 100 ng/mL) y desde el control del día 21 de MSC-MO tratadas con el vehículo. En el análisis de la expresión del mRNA de *DAZL* y

*OCT4* no detectaron diferencias ( $P>0,05$ ) entre los tratamientos (Figura 9A). Sin embargo, se detectó un aumento ( $P<0,05$ ) en los niveles de mRNA de *NANOG* en MSC-MO tratadas con 1 ng/mL (0,94 veces la expresión del día 0) en el día 21. En el análisis del efecto temporal de TGF $\beta$ 1 sobre la diferenciación germinal de las MSC-MO fetales bovinas, las células fueron cultivadas por 21 días utilizando una concentración de 100 ng/mL de TGF $\beta$ 1. Esta concentración fue utilizada debido a que potencialmente podría permitir una mayor expresión de los genes germinales. Las muestras celulares fueron tomadas los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo. No se detectaron diferencias ( $P<0,05$ ) en los niveles de expresión de mRNA de los genes *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* en las MSC-MO tratadas con TGF $\beta$ 1 comparando el control con el día 21.



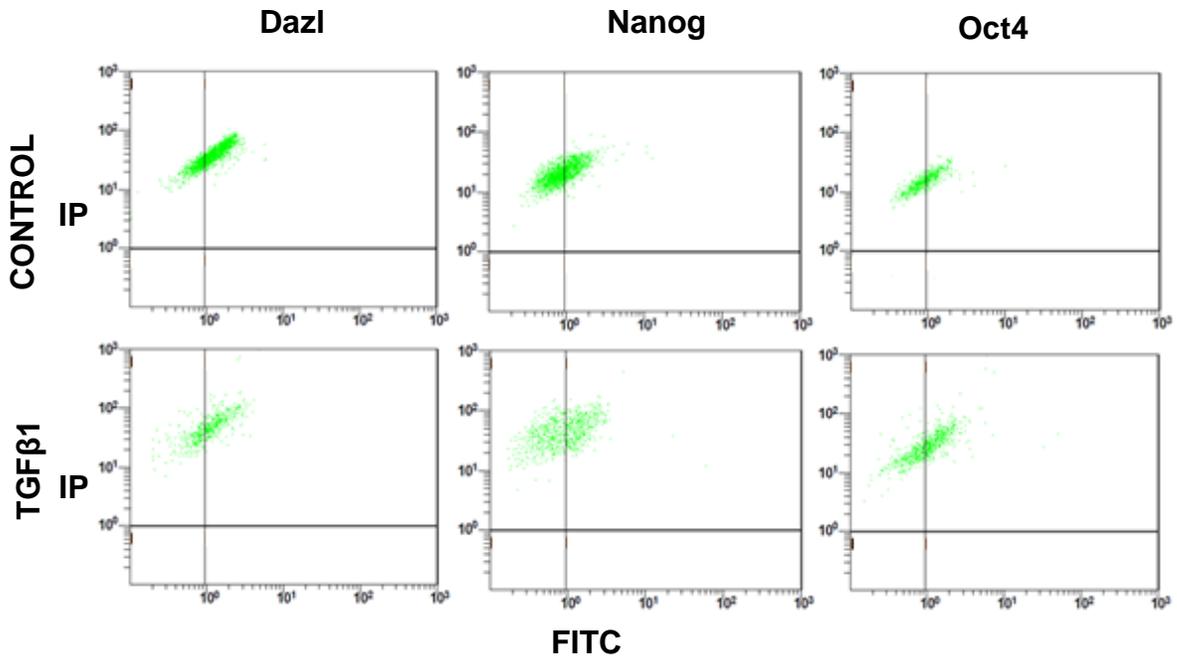


**Figura 9.** Expresión de los genes *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* en MSC-MO fetales bovinas tratadas con TGFβ1. En el análisis dosis-respuesta (A), se detectó un aumento ( $P < 0,05$ ) en los niveles de mRNA de *NANOG* en la dosis de 1 ng/mL. No se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en la expresión de *DAZL* y *OCT4*. En el análisis temporal (B), no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) en la expresión de *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* entre las células tratadas con TGFβ1 y el cultivo control. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas entre las dosis.  $n = 3$  (ANOVA). Abreviación: CO, control; D0, día 0.

#### 6.4.3 Expresión de los marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO fetales bovinas expuestas a TGFβ1

Las MSC-MO fetales bovinas fueron cultivadas durante 21 días y suplementadas con 100 ng/mL de TGFβ1, con el objetivo de evaluar la expresión de Dazl, Oct4 y Nanog mediante citometría de flujo. Se colectaron muestras el día 21 desde las células tratadas con TGFβ1 y desde el cultivo control tratado con el vehículo. No

se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en el porcentaje de MSC-MO positivas a Dazl y Oct4 entre el cultivo control y el cultivo suplementado con TGF $\beta$ 1. Sin embargo, una mayor proporción ( $P < 0,05$ ) de MSC-MO fue positiva a Nanog en el grupo control ( $46,9\% \pm 1,6$ ) en comparación con las MSC-MO tratadas con TGF $\beta$ 1 ( $37,8\% \pm 1,4$ ) al final del período de cultivo de 21 días.

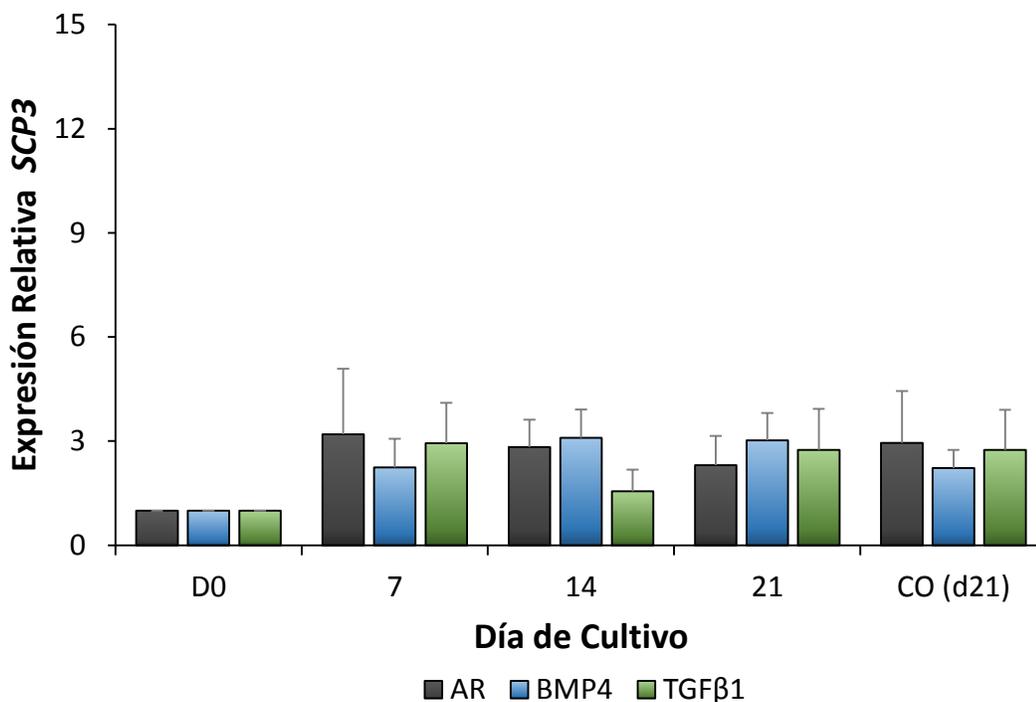


PROTEÍNA	CONTROL	TGF $\beta$ 1
Dazl	$64,4 \pm 11,6$	$60,3 \pm 4,3$
Nanog	$46,9 \pm 1,6^a$	$37,8 \pm 1,4^b$
Oct4	$45,5 \pm 5,7$	$44,7 \pm 3,6$

**Figura 10.** Disminución de la expresión del marcador Nanog en MSC-MO fetales bovinas tratadas con TGF $\beta$ 1. Citometría de flujo (Dotplot). Un porcentaje mayor ( $P < 0,05$ ) de MSC-MO fueron positivas a Nanog en el cultivo control en comparación al cultivo suplementado con TGF $\beta$ 1. No se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en el porcentaje de MSC-MO positivas a Dazl y Oct4 en las células tratadas y los cultivos controles. Superíndices distintos (a,b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre cultivos. Abreviación: IP, yoduro de propidio.

## 6.5 Niveles de mRNA del marcador de meiosis *SCP3* en MSC-MO fetales bovinas tratadas con AR, BMP4 o TGFβ1

Adicionalmente, durante la diferenciación germinal se analizó el efecto temporal de los factores inductores AR, BMP4 y TGFβ1 sobre los niveles de mRNA del marcador de meiosis *SCP3*. Las MSC-MO fetales bovinas fueron cultivadas por 21 días con las concentraciones de 0.1 μM de AR, 100 ng/ml de BMP4 y 100 ng/mL de TGFβ1 más los cultivos controles. Las muestras para el análisis fueron tomadas en los días 0, 7, 14 y 21 en cada grupo experimental y fueron analizadas mediante Q-PCR. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los niveles de mRNA de *SCP3* entre MSC-MO suplementadas con los factores inductores y los grupos controles en ninguno de los días analizados.



**Figura 11.** Niveles de mRNA de *SCP3* en MSC-MO fetales bovinas cultivadas por 21 días en medio de cultivo suplementado con AR, BMP4 o TGFβ1. No se detectaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en los niveles de mRNA de *SCP3* entre los días de cultivo en ninguno de los tratamientos.  $n = 3$  (ANOVA). Abreviación: CO, control; D0, día 0.

Para la evaluación del perfil de diferenciación, se analizó la expresión de los genes relacionados con la pluripotencia y linaje germinal mediante Q-PCR. La expresión de mRNA de los genes *FRAGILIS*, *STELLA*, *PIWIL2*, *STRA8* y *VASA* no fue detectada en las MSC-MO fetales bovinas tratadas y no tratadas con los factores tanto en el análisis del efecto dosis-respuesta como en la suplementación para el análisis temporal (Tabla 2).

<b>Genes Evaluados</b>	<b>Estado</b>
<i>OCT4</i>	Detectado
<i>NANOG</i>	Detectado
<i>FRAGILIS</i>	No detectado
<i>STELLA</i>	No detectado
<i>DAZL</i>	Detectado
<i>PIWIL2</i>	No detectado
<i>STRA8</i>	No detectado
<i>VASA</i>	No detectado
<i>SCP3</i>	Detectado

**Tabla 2.** Genes evaluados mediante Q-PCR en MSC-MO tratadas con AR, BMP4 o TGF $\beta$ 1.

## 7. DISCUSIÓN

La diferenciación germinal de MSC representa un potencial método alternativo para la obtención *in vitro* de gametos de macho en las distintas especies. En el caso de los animales, la producción de gametos *in vitro* podría ser utilizada en varios aspectos que incluyen el mejoramiento genético, la conservación de especies en peligro de extinción y la producción de animales transgénicos. Las MSC pueden ser potenciales candidatas para la producción de gametos considerando su fácil obtención, potencial de diferenciación multipotente y bajo rechazo inmune (Dobrinski, 2008). Sin embargo, en la especie bovina no existen antecedentes sobre el potencial de diferenciación germinal de MSC. En el presente trabajo de investigación se evaluó la capacidad de diferenciación germinal de MSC-MO fetales bovinas bajo condiciones *in vitro*. Se evaluó la suplementación exógena de tres biofactores que participan en el proceso de diferenciación germinal *in vivo* AR, BMP4 y TGF $\beta$ 1. La caracterización del perfil germinal se evaluó mediante determinación de la expresión de genes pluripotencialidad como *OCT4* y *NANOG*, genes germinales como *FRAGILIS*, *STELLA*, *VASA*, genes germinales de macho como *DAZL*, *PIWIL2*, *STRA8* y el marcador de meiosis *SCP3*.

Las MSC-MO fueron aisladas y caracterizadas en base a su capacidad de adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo, lo que permitió establecer un cultivo primario relativamente homogéneo con crecimiento en monocapa como ha sido reportado previamente (Cortés et al., 2013). Además, la pureza de los cultivos fue previamente evaluada mediante el análisis los marcadores mesenquimales CD105, CD90 y CD73 y hematopoyéticos CD45 y CD34. Las MSC-MO de 3<sup>er</sup> o 4<sup>to</sup> pasaje fueron tratadas con AR, BMP4 y TGF $\beta$ 1 por un periodo de 21 días para luego analizar la expresión de genes germinales, tanto por el efecto de distintas concentraciones, como en el análisis temporal con la suplementación de una concentración óptima. A pesar de que en este estudio

se detectó la expresión del marcador germinal *DAZL* y de los genes de pluripotencia *OCT4* y *NANOG*, otros genes germinales evaluados como *STELLA*, *FRAGILIS*, *VASA*, *PIWIL2* y *STRA8* no fueron detectados. En el caso de *VASA* y *PIWIL2*, estudios previos han reportado su expresión en MSC-MO ovinas, tanto tratadas como no tratadas con AR o BMP4 (Hua et al., 2009; Shirazi et al., 2012; Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014). En forma similar, la expresión de *FRAGILIS*, *STELLA*, *VASA*, *PIWIL2* ha sido descrita en MSC-MO humanas tratadas con AR y controles no tratados (Drusenheimer et al., 2007; Hua et al., 2009). En este sentido es posible que las diferencias entre especie de origen y los protocolos de aislamiento y diferenciación, podría explicar los diferentes perfiles de expresión de marcadores germinales detectados en reportes anteriores en comparación con nuestro estudio. La función de cada uno de estos marcadores durante el proceso de diferenciación germinal ha sido descrita principalmente en la especie murina. *FRAGILIS* y *STELLA* son genes involucrados en la iniciación del proceso de especificación de las PGC y su demarcación de las células vecinas (Nayernia et al., 2006). *STELLA* es el primer gen (conocido) que se expresa en el linaje restringido a convertirse en PGC y posteriormente en células germinales (Saitou et al., 2002). Se ha descrito que la expresión de *STELLA* es inducida por la alta expresión de *FRAGILIS* durante la especificación de las PGC por lo que existe una relación entre estos dos genes (Saitou et al., 2002). A su vez la expresión de estos dos genes *in vivo* en las PGC requiere de señales específicas que se cree están asociadas al nicho celular, lo cual podría ser necesario para la inducción de *FRAGILIS* y *STELLA* en las MSC-MO durante la diferenciación germinal (Saitou, et al., 2002). *PIWIL2* es un miembro de la familia de proteínas AGO/PIWI que participa en la auto-renovación de las espermatogonias, espermatogénesis y en la reparación del DNA por daños de agentes genotóxicos (Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2012). La expresión *STRA8* es inducida por AR y es importante para el inicio de la meiosis en procesos como la cohesión y la formación del complejo sinaptonémico (Wang et al., 2014). Tanto *PIWIL2* como *STRA8* son genes principalmente pre-meióticos,

es decir, se expresan en las células germinales en la profase meiótica por lo que se consideran como genes de la etapa tardía de la formación de la línea germinal (Busada y Gerber, 2016). La no expresión de *PIWIL2* y *STRA8* en las MSC-MO fetales bovinas en este estudio, puede ser debido a que los factores indujeron una etapa temprana de diferenciación germinal.

La evaluación del potencial de diferenciación de MSC hacia la línea germinal, utilizando diferentes factores inductores como AR y BMP4 ha sido reportada previamente (Nayernia et., 2006; Shizari et al., 2012; Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). Sin embargo, varios de estos trabajos han utilizado AR en MSC-MO, lo que enfatiza la importancia de este factor en la diferenciación germinal. AR es un metabolito de la vitamina A que desempeña un papel esencial en la fisiología reproductiva (Carlson, 2014). El retinol se une a receptores específicos en la superficie celular, entra en el citoplasma, siendo transformado, primero en retinaldehído y luego en AR (Kam et al., 2012). El AR es transportado hacia el núcleo, donde se une a elementos de respuesta del ácido retinoico (RARE; Retinoic acid response element) en el ADN (Carlson, 2014). Estos RARE generalmente se encuentran en la región potenciadora de los genes inducidos por AR, por lo que actúa como un factor de transcripción (Carlson, 2014).

En nuestro estudio, el efecto de AR sobre las MSC-MO fue evaluado inicialmente mediante observación de cambios morfológicos cada 7 días durante el periodo de cultivo (21 días). Al final de dicho período, las MSC-MO suplementadas con AR presentaron una forma poligonal o estrellada con prolongaciones citoplasmáticas diferente a la morfología fibroblastoide exhibida en el cultivo control. Este mismo análisis, en MSC-MO de ovinos y humanos, utilizando AR como factor inductor, se ha reportado que las células expuestas a AR presentan una forma oval o redondeada (Hua et al., 2009; Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2012). Esta diferencia morfológica puede estar condicionada a la especie de la cual provienen las MSC-MO, el período de cultivo y las concentraciones de AR utilizadas en cada estudio.

Adicionalmente a la evaluación morfológica, en el presente estudio se evaluó la expresión del marcador germinal *DAZL* y de los genes de pluripotencia *NANOG* y *OCT4*, tanto en MSC-MO tratadas con AR como en el cultivo control. La expresión de *DAZL* y *NANOG* aumentó luego del tratamiento con AR, lo que indica que este factor promueve la expresión de genes de diferenciación germinal en MSC-MO fetales bovinas. AR no solo induce la expresión de mRNA de *DAZL*, sino que, además, induce la traducción de ese mRNA en proteína y la disminución de la expresión de Oct4. En estudios realizados en ESC se reveló que *DAZL* regulaba negativamente la expresión de genes de pluripotencia como *OCT4* y *SOX2*, además de *VASA*, que es necesario para el desarrollo de la línea germinal (Xu et al., 2013; Chen et al., 2014). Confirmando lo expuesto por algunos autores donde señalan que, *DALZ* crea un balance entre la pluripotencia y la diferenciación germinal para prevenir la diferenciación espontánea no deseada hacia la línea germinal (Smorag et al., 2014). De esta forma, *DAZL* se expresa en la mayor parte del proceso de formación de las células germinales y es necesario tanto para su especificación como para su maduración (Lacham-Kaplan, 2004). *NANOG* y *OCT4* son factores de transcripción que regulan la pluripotencia durante el desarrollo embrionario (Tang et al., 2016). *OCT4* está presente desde la formación del cigoto, pero su nivel de expresión desciende a medida que las estructuras embrionarias se van especializando (Kehler et al., 2004). No obstante, su expresión se mantiene en las PGC en formación, perdurando durante la proliferación y migración hacia las crestas genitales (Kehler et al., 2004). En los machos después del nacimiento, *OCT4* permanece en gonocitos, pro-espermatogonias y espermatogonias indiferenciadas (Lacham-Kaplan, 2004). La expresión de *NANOG* está controlada por la interacción de *OCT4* y *SOX2*, manteniendo en conjunto el estado indiferenciado de las PGC (Tang et al., 2016). Tanto el aumento de la expresión de *Dazl* como la disminución de la expresión de Oct4 luego de 21 días de cultivo en presencia de AR (evaluado mediante citometría de flujo), sugieren que este factor puede tener un rol

importante en el inicio del proceso de diferenciación hacia la línea germinal en las MSC-MO.

BMP4 es una molécula señalizadora perteneciente a la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  que desempeña importantes funciones en el desarrollo de la mayoría de las estructuras del embrión (Carlson, 2014). Estudios realizados MSC-MO provenientes de ratones y ovinos han reportado aumentos en la expresión de *DAZL* en células suplementadas con BMP4, lo que indica que este factor de crecimiento estimula la aparición de genes característicos de las células germinales en las MSC-MO (Shirazi et al., 2012; Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). En nuestro estudio, las MSC-MO suplementadas con BMP4 presentaron una forma poligonal en concentraciones de 10, 50 y 100 ng/mL, sin embargo, estos cambios morfológicos fueron más marcados en células expuestas a la concentración más alta, lo que sugiere que existe un efecto dosis-respuesta asociado al cambio morfológico. La morfología de MSC-MO fetales bovinas posterior a la inducción con BMP4 ha sido poco evaluada, existiendo solo registros en MSC-MO de ovinos donde se menciona que las células no presentaron cambios morfológicos (Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). Con respecto a la expresión de los genes germinales se pudo determinar que MSC-MO expuestas a 10, 50 y 100 ng/mL de BMP4 mantuvieron la expresión de *DAZL*, *NANOG* y *OCT4* sin cambios, desde el inicio hasta la finalización del período de cultivo. Sin embargo, en el análisis temporal del efecto de BMP4 (100 ng/mL), los niveles de mRNA de *DAZL* aumentaron a partir del día 7 de inducción alcanzando su mayor nivel en el día 14 y luego disminuyendo hacia el día 21. Estos resultados sugieren que BMP4 indujo la expresión de *DAZL* en forma transitoria durante la diferenciación germinal de MSC-MO. Comparativamente, la expresión génica de *NANOG* y *OCT4* no presentó variaciones durante el periodo de cultivo, lo que sugiere que las MSC-MO mantienen un estado multipotente durante la inducción con BMP4.

El factor TGF $\beta$ 1 pertenece a la familia de factor de crecimiento transformante  $\beta$  y desempeña un papel importante en la migración de las PGC, actuando como quimioatrayente de las PGC hacia las crestas genitales (Itman et al., 2006). En nuestro estudio, las MSC-MO suplementadas con TGF $\beta$ 1 formaron agregados celulares en gran número y de tamaños variados al final de período de cultivo. La formación de estos agregados coincide con reportes previos en MSC-MO de ovinos, donde se observó la formación de colonias celulares (Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). Estas células diferenciadas también aumentaron la expresión de *VASA* (Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014; 2016). *VASA* en humanos se expresa en las PGC durante el proceso de migración, espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas, lo que sugiere que *VASA* es necesario para la mantención y funcionamiento de las células germinales (Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). A pesar de que en el presente trabajo no se pudo detectar la expresión de *VASA* bajo la suplementación con TGF $\beta$ 1, fue posible detectar la expresión de *DAZL* (gen germinal) y *NANOG* y *OCT4* (genes de pluripotencia). Esto indicaría que podrían existir diferencias en la expresión de *VASA* según la especie de origen de las MSC-MO y a la regulación que ejerce *DAZL* sobre este gen (Smorag et al., 2014).

Finalmente, el marcador de meiosis *SCP3* forma parte del complejo sinaptonémico que tiene como función garantizar el perfecto apareamiento entre cromosomas homólogos durante la fase de zigoteno de la primera división meiótica, tanto en células germinales de machos como hembras (Fraune et al., 2012). *SCP3*, también llamada *Cor1*, aparece en los espermatoцитos leptenos y desaparece en la meiosis tardía (Yuan et al., 2000). *SCP3* junto con *SCP2* forma parte de los elementos axiales/laterales del SC, siendo esencial para su formación y mantenimiento (Yuan et al., 2000). Existen reportes de que las MSC-MO murinas pueden expresar *SCP3* bajo la inducción con AR durante 15 días de cultivo (Hua et al., 2009). Sin embargo, no existen antecedentes sobre la expresión de este marcador en MSC-MO bajo la inducción de BMP4 o TGF $\beta$ 1

(Ghasemzadeh-Hasankolaei, et al., 2014). Nuestros resultados indican que las MSC-MO fetales bovinas expresan SCP3 tanto antes como después del tratamiento con BMP4, TGFβ1 o AR. Sin embargo, su expresión no varía durante el periodo total. Lo anterior podría sugerir que estos factores por sí solos no son capaces de inducir el proceso de meiosis en las MSC-MO fetales bovinas.

En conclusión, las MSC-MO fetales bovinas expresan genes de pluripotencia *OCT4* y *NANOG* y el marcador germinal *DAZL*; sin embargo no expresan los genes germinales *FRAGILIS*, *STELLA*, *VASA*, *PIWIL2* y *STRA8*. Considerando los factores de diferenciación evaluados, AR fue más efectivo en inducir diferenciación germinal en las MSC-MO ya que aumento el nivel de expresión tanto mRNA como de proteína de Dazl y disminuyo la expresión de Oct4.

## 8. REFERENCIAS

**AARABI, M.; MODARRESSI, M. H.; SOLTANGHORAEE, H.; BEHJATI, R.; AMIRJANNATI, N.; AKHONDI, M. M.** 2006. Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*. Vol 82 (2): 325-331.

**ARÉVALO, J. A.; PÁEZ, D. M.; RODRÍGUEZ, V. M.** 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 5(8):101 - 212.

**BERNARD, A.** 2015. *Biología de las células madre 9º edición digital*. [En línea] <[http://www.guzlopeditoras.com/web\\_des/bio01/biolmole/pld1969.pdf](http://www.guzlopeditoras.com/web_des/bio01/biolmole/pld1969.pdf)> [consulta: 25-04-2016].

**BIANCO, P.; CAO X.; FRENETTE, P. S.; MAO, J. J.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J.; WANG, C.** 2013. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature Medicine*. 19(1):35 - 42.

**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

**BOWLES, J.; KNIGHT D.; SMITH, C.; WILHELM, D.; RICHMAN, J.; MAMIYA, S.; YASHIRO, K.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; WILSON, M. J.; ROSSANT, J.; HAMADA, H.; KOOPMAN, P.** 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*. 312: 596 - 600.

**BUSADA, J. T.; GEYER, C. B.** 2016. The Role of Retinoic Acid (RA) in Spermatogonial Differentiation. *Biology of Reproduction*. 94(1): 1 – 10.

**CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.; KUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M.** 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 98(8): 2396 - 2402.

**CAPLAN, A. I.**, 1991. Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9(5): 641 - 650.

**CARLSON, B. M.**, 2014. Bases moleculares del desarrollo embrionario. In: *Embriología humana y biología del desarrollo*. (5ºed). Elsevier S.L. Barcelona, España. pp. 58-74.

**CHANG, Y.-J.; TSENG, C.-P.; HSU, L.-F.; HSIEH, T.-B.; HWANG, S.-M.** 2006. Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biology International*. 30(6): 495 - 499.

**CHEN, H.; WELLING, M.; BLOCH, D.; MUÑOZ, J.; MIENTJES, E.; CHEN, X.; TRAMP, C.; WU, J.; YABUUCHI, A.; CHOU, Y.; BUECKER, C.; KRAINER, A.; WILLEMSSEN, R.; HECK, A.; GEIJSEN, N.** 2014. *DAZL* limits pluripotency, differentiation, and apoptosis in developing primordial germ cells. *Stem Cell Reports*. 3: 892 – 904.

**CHUAIRE, L.; SANCHEZ, M. C.** 2002. Células germinativas primordiales femeninas: origen y migración hacia los primordios gonadales. *Colombia Médica*. 3(4): 171 - 178.

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

**DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P.** 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*. 44(8): 1928 – 1942.

**DE FELICI, M.** 2013. *Origin, migration and proliferation of human primordial germ cell*. In: Oogenesis (Eds.). Springer. London, Inglaterra. pp.19 - 37.

**DE ROOIJ, D. G.; GROOTEGOED, J. A.** 1998. Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 10(6): 694 - 701.

**DE SOUSA LOPES, S. M.; MCLAREN, A.** 2013. Primordial Germ Cells in Mouse and Humans. In: Lanza, R.; Atala, A. *Handbook of Stem Cells: Pluripotent Stem Cells*. (Eds.). Elsevier. Londres, Inglaterra pp. 179 - 188.

**DOBRINSKI, I.** 2008. Male Germ Cell Transplantation. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Suppl. 2): 288 - 294.

**DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEAN, 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.

**DRUSENHEIMER, N.; WULF, G.; NOLTE, J.; LEE, JH.; DEV, A.; DRESSEL, R.; GROMOLL, J.; SCHMIDTKE, J.; ENGEL, W.; NAYERNIA, K.** (2007). Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 63:69–76.

**DUEÑAS, F.; BECERRA, V.; CORTES, Y.; VIDAL, S.; SÁENZ, L.; PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M.; PERALTA, O. A.** 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Veterinary Research*. 10(1): 1-13.

**FRAUNE, J.; SCHRAMM, S.; ALSHEIMER, M.; BENAVENTE R.** 2012. The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*. Vol 318 (12): 1340-1346.

**FORTIER, L. A.** 2005. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*. 34(5): 415–423.

**FRIEDENSTEIN, A. J.; DERIGLAZOVA, U.; KULAGINA, N.; PANASUK, A. F.; RUDAKOWA, S. F.; LURIÁ, E. A.; RUADKOW, I. A.** 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*. 2(2): 83-92.

**FRISÉN, J.** 2002. Stem Cell Plasticity?. *Neuron*. 35(3): 415 –4 18.

**GÁLVEZ-GASTÉLUM, F. J.; SANDOVAL-RODRÍGUEZ, A. S.; ARMENDÁRIZ-BORUNDA, J.** 2004. El factor de crecimiento transformante  $\beta$  como blanco terapéutico. *Salud Pública México*. 46(4):341 - 350.

**GAZIT, Z.; PELLÉD, G.; SHEYN, D.; KIMELMAN, N.; GAZIT, D.** 2013. Mesenchymal Stem Cells. *In*: Lanza, R.; Atala, A. *Handbook of Stem Cells*. (2° ed). Elsevier Inc. San Diego, USA. pp. 513- 520.

**GHASEMZADEH-HASANKOLAEI, M.; ESLAMINEJAD, M. B.; BATAVANI, R.; SEDIGHI-GILANI, M.** 2012. Comparison of the efficacy of three concentrations of retinoic acid for transdifferentiation induction in sheep marrow-derived mesenchymal stem cell into male germ cells. *Journal of Andrology*. 46: 24-35.

**GHASEMZADEH-HASANKOLAEI, M.; SEDIGHI-GILANI, M. A.; ESLAMINEJAD, M. B.** 2014. Induction of Ram Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Germ Cell Lineage using Transforming Growth Factor-b Superfamily Growth Factors. *Reproduction in Domestic Animals*. 49: 588–598.

**HOGARTH, C. A.; GRISWOLD, M. D.** 2013. Retinoic acid regulation of male meiosis. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 20(3): 217 - 223.

**HUA, J.; PAN, S.; YANG, C.; DONG, W.; DOU, Z. SIDHU K. S.** 2009. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reproductive Biomedicine Online*. 19(1): 99 - 105.

**HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M.** 2010. *Essentials of Domestic Animal Embriology*. (Eds.). Saunders Elsevier. Toronto, Canadá. pp 32 - 55.

**INGMAN, W. V.; ROBERTSON, S. A.** 2002. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *BioEssays*. 24(10): 904 – 914.

**INGMAN, W. V.; ROBERTSON, S. A.** 2007. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Null Mutation Causes Infertility in Male Mice Associated with Testosterone Deficiency and Sexual Dysfunction. *Endocrinology*. 148(8): 4032 - 4043.

**ITMAN, C.; MENDIS, S.; BARAKAT, B.; LOVELAND, K. L.** 2006. All in the family: TGF-b family action in testis development. *Reproduction*. 1470–1626

**IZADYAR, F.; DEN OUDEN, K.; CREEMERS, L. B.; POSTHUMA, G.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ D. G.** 2002. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*. 124(1): 85 – 94.

**KAM, R.; DENG, Y.; CHEN, Y.; HUI ZHAO, H.** 2012. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell & Bioscience*. 2(11) 1 - 14.

**KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELÍ, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN K. J.; SCHÖLER, H. R.; TOMILIN A.** 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *European Molecular Biology Organization*. 5(11):1078 - 1083.

**KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER H.; BIEBACK K.** 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 24(5): 1294 – 1301.

**KOUBOVA, J., HU, Y.-C.; BHATTACHARYYA, T.; SOH, Y. Q.; GILL, M. E.; GOODHEART, M. L.; HOGARTH, C. A.; GRISWORLD, M. D.; PAGE, D. C.** 2014. Retinoic acid activates two pathways required for meiosis in mice. *PLOS Genetics*. 10(8):1 - 9.

**KURIMOTO, K.; YAMAJI, M.; SEKI, Y.; SAITOU, M.** 2008. Specification of the germ cell lineage in mice: A process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14. *Cell Cycle*, 7(22): 3514 - 3518.

**LACHAM-KAPLAN, O.** 2004. In vivo and in vitro differentiation of male ger cells in the mouse. *Reproduction*. 128(1): 147 - 152.

**LAWSON, K. A.; DUNN, N. R.; ROELEN, B.; ZEINSTR, L. M.; DARVIS, A. M., WRIGHT, C.; KORVING, J.; HOGAN B.** 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development*. 13(4): 424 - 436.

**LEE, I.-C.; WANG, J.-H.; LEE, Y.-T.; YOUNG, T.-H.** 2007. The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 352(1):147-152.

**MENDES, S. C.; ROBIN, C.; DZIERZAK, E.** 2004. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development and disease*. 132(5): 1127-1136.

**MERRELL, A. J.; STANGER, B. Z.** 2016. Adult cell plasticity in vivo: de differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nature Review-Molecular Cell Biology*, 17(1), 413 – 425.

**MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R.** 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*. 113(7): 1161-1166.

**NAYERNIA, K.; DRUSENHEIMER, N.; NOLTE, J.; WULF, G.; DRESSEL, R.; GROMOLL, J.; ENGEL, W.** 2006. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Laboratory Investigation*. 86(7): 654 - 663.

**PAGE, S.; HAWLEY, S.** 2004. The genetic and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol 20: 525-558.

**PERALTA-ZARAGOZA, O.; LAGUNAS-MARTÍNEZ, A.; MADRID-MARINA, V.** 2001. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México*. 43(4): 340 - 351.

**PITTENGER, M. F.** 2011. Mesenchymal stem cells. **In:** Kadereit, S.; Udolph, G. *Umbilical Cord Blood: A Future for Regenerative Medicine?*. (Eds.). World Scientific Publishing. Sinagpur. pp. 89 - 221.

**RAMATHAL, C.; REIJO, R.; TUREK, P.** 2016. *Embryonic Stem Cells and the Germ Cell Lineage*. [En línea] <<http://www.intechopen.com/books/embryonic-stem-cells-basic-biology-to-bioengineering/embryonic-stem-cells-and-the-germ-cell-lineage>> [Consulta: 25 -04-2016].

**ROSSITTO, M.; PHILIBERT, P.; POULAT, F.; BOIZET-BONHOURE, B.** 2015. Molecular events and signalling pathways of male germ cell differentiation in mouse. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45(1): 84 – 93.

**SAITOU, M.** 2009. Germ cell specification in mice. *Current Opinion in Genetics & Development*. 19(4): 386 - 395.

**SAITOU, M.; BARTON, S. C.; SURANI M. A.** 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*. 418: 293 - 300.

**SAITOU, M.; YAMAJI, M.** 2012. Primordial Germ Cells in Mice. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4(11): 1 - 20.

**SHI, S.; BARTOLD, P. M.; MIURA, M.; SEO, B.M.; ROBEY, P.G.; GRONTHOS, S.** 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & Craniofacial Research*. 8(3): 191 - 199.

**SHIRAZI, R.; ZARNANI, A. H.; SOLEIMANII, M.; ABDOLVAHABI, M. A.; NAYERNIA, K.; KASHANI, I. R.** 2012. BMP4 can generate primordial germ cells from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Cell Biology International*. 36 (12): 1185–1193

**SMORAG, L.; XU, X.; ENGEL, W.; PANTAKANI D. V.** 2014. The roles of *DAZL* in RNA biology and development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 5(4):527-535.

**TANG, W. W.; KOBAYASHI, T.; IRIE, N.; DIETMANN, S.** 2016. Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nature Review Genetic*. 17: 585 - 600.

**TORTELOTE, G. G.; MANUEL HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.; QUARESMA, A.; NICKERSON J. A.; IMBALZANO A. N.; RIVERA-PÉREZ J.A.** 2013. Wnt3 function in the epiblast is required for the maintenance but not the initiation of gastrulation in mice. *Developmental Biology*. 374(1): 164 - 173.

**TRAUTMANN, E.; GUERQUIN, M.-J.; DUQUENNE, C.; LAHAYE, J.-B.; HABERT, R.; LIVERA, G.** 2008. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle*. 7(5): 656 - 664.

**UFUK, G.; M. AZIM, S.** 2016. Developmental Competence for Primordial Germ Cell Fate. *Current Topics in Developmental Biology*. 117: 471-496.

**WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L.** 2004. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. 116(5): 639 – 648.

**WANG, R. N., GREEN, J.; WANG, Z.; DENG, Y.; QIAO, M.; PEABODY, M.; ZHANG, Q.; YE, J.; YAN, Z.; DENDULURI, S.; IDOWU, O.; LI, M.; SHEN, C.; HU, A.; HAYDON, R. C.; KANG, R.; MOK, J.; LEE, M. J.; LUU, H. L.; SHI, L. L.** 2014. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases*, 1(1): 87 - 105.

**WANG, X.; CHEN, T.; SONG, C.; GAO, B.; ZHANG, Y.** 2014. Cloning and Expression Characteristics of the Pig *Stra8* Gene. *International Journal of Molecular Science*. 15: 12480-12494.

**WEST, F. D., SHIRAZI R., MANDANPOUR, P., OZCAN, S., DINC, G., HODGES, D.** 2013. In vitro–derived gametes from stem cells. *Seminars in Reproductive Medicine*. 31(1):33 - 38.

**WROBEL, K.-H., BICKEL, D., KUJAT, R., SCHIMMEL, M.** 1995. Evolution and ultrastructure of the bovine spermatogonia precursor cell line. *Cell and Tissue Research*. 281(2): 249 - 259.

**YUAN, LI.; LIU, J.; ZHAO, J.; BRUNDELL, E.; DANEHOLT, B.; HÖÖG, C.** 2009. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis and male fertility. *Molecular Cell*. 5: 73 - 83.

**ZHANG, J., LI, L.** 2005. BMP signaling and stem cell regulation. *Developmental Biology*, 284(1): 1 - 11.

**ZHOU, Q.; GRISWOLD, M. D.** 2008. Regulation of spermatogonia. StemBook, ed. The Stem Cell Research Community. [En línea] <<http://www.stembook.org>> [consulta: 5-05-2016].