



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

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE CO-CULTIVO DE CÉLULAS  
DE SERTOLI PARA DIFERENCIACIÓN GERMINAL DE  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC) FETALES BOVINA**

**MOISÉS NUNDA SEGUNDA**

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

**Santiago-Chile**

**2017**



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

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE CO-CULTIVO DE CÉLULAS  
DE SERTOLI PARA DIFERENCIACIÓN GERMINAL DE  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC) FETALES BOVINA**

**MOISÉS NUNDA SEGUNDA**

**Tesis para optar al Grado de  
Magíster 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 EL CANDIDATO

**MOISÉS NUNDA SEGUNDA**

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA  
22 DE DICIEMBRE DE 2017

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. OSCAR PERALTA T. ....

**COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS**

DRA. MÓNICA DE LOS REYES S. ....

DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ G. ....

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

**Proyecto Fondecyt 1161251**

## **BIOGRAFÍA**

### **Moisés Nunda Segunda**

Nací el 22 de octubre de 1983 en la Provincia de Huambo/Angola, mis estudios primarios los cursé en la escuela N° 2, Kalundu/Huambo, estudios secundarios en la escuela Comandante Bula/Huambo. Posteriormente estudié enfermería en el Instituto Medio de Salud del Huambo, obteniendo el grado de técnico medio de enfermería en el año 2005 y en ese año obtuve mi primer empleo en Pediatría del Hospital General de Huambo. “controversia” en ese mismo año ingrese la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Agostinho Neto, por razones lejanas a mi voluntad y/o oportunidad, así que en una parte del día trabajaba con pacientes humanos y otra estudiaba ciencias animales. En el año 2010 mientras me gradué, fui a trabajar en el Ministerio de la Industria Geología y Minerías en el departamento de Inspección de la industria/Gobierno Provincial de Huambo.

En el año 2011 comencé a desarrollarme en la carrera docente y fui a trabajar como profesor de Legislación Comercial Laboral y Fiscal (aunque sin formación en esa área, tuve que adquirir habilidad) en el Instituto medio Agrario de Waku-Kungo/Kuanza Sul-Angola. En ese mismo año fui seleccionado para estudiar un diplomado en transformación y conservación de productos de origen animal, en Vila Nova De Gaias-Porto/Portugal, cooperación Universidad de Porto y Ministerio de Enseñanza del Gobierno de Angola.

En el año 2012 mediante concurso público ingresé la Facultad de Medicina Veterinaria/Universidad José Eduardo dos Santos (FMV/UJES) como docente asistente de Semiología Medica Veterinaria en el departamento de sanidad animal, donde trabajo hasta el presente. En el 2014 fui seleccionado para estudiar el curso Modelos de Enseñanza Superior, en el ISEC/Universidad Coímbra/Portugal dirigido a los profesores de enseñanza superior, cooperación Universidad de Coimbra/Portugal y UJES/Angola.

En el 2015 postulé a Programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Escuela de Postgrado y Postítulo de la FAVET/Universidad de Chile, a AGCID – Beca Nelson Mandela y a INAGBE (Instituto Nacional de gestión de Becas/Angola). En el año 2016 inicié el Programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias.

## **DEDICATORIA**

Para mis padres **Alberto Segunda y Victoria Cauape**, a mi esposa **Mauricia Kapitango** y a mis hijos “mellizos” **Alberto de Vitorias Segunda y Bernardina Kapitango Segunda**

¡No todos los libros son propios para ser ofrecidos!

Este es, ciertamente, de aquellos que no se ofrecen, pero dedicándolo sólo tuve en vista compensarles un poco de las horas que me aparté de su convivencia, absorbido en este trabajo.

M. Nunda Segunda

## **AGRADECIMIENTO**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas instituciones y personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Agradezco al Fondecyt 1161251 (entidad financiadora del proyecto), AGCID y INAGBE (entidades chilena y angoleña, financiadoras de mi Beca respectivamente a través del programa de Beca Nelson Mandela), FAVET (donde recibí clases) y UJES (donde trabajo), también agradezco a la planta Faenadora Cordillera Puente Alto que nos dio las muestras.

Especialmente agradezco al Dr. Oscar Peralta Troncoso, director de esta investigación, por la orientación, seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo del trabajo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de la Dra. Javiera Bahamonde y del Dr. Cristian Torres, con quien me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada. También me gustaría agradecer la ayuda recibida del Dr. Jaime Palomino, Dra. Mónica de los Reyes y la Dra. Daniela Iranguen por su orientación académica durante el curso del magíster.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del programa de magíster y LACIV y, especialmente a los tesisistas en MSC, Olger Hauman, Miguel Jervis, Berly Cahuascano, Jahaira Cortez, Isidora Muñoz, Sofía Sepúlveda, René Oliva, Fabrizio y Valentina Faúnde por su amistad y colaboración.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1  |
| <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 4  |
| Características de las MSC.....  | 4  |
| Fuentes tisulares de MSC.....  | 4  |
| Diferenciación germinal durante el desarrollo embrionario .....  | 5  |
| Espermatogénesis .....   | 7  |
| Rol de las CS durante la espermatogénesis .....  | 8  |
| Diferenciación germinal de las MSC.....  | 9  |
| <b>Hipótesis</b> .....   | 10 |
| <b>Objetivo general</b> .....  | 10 |
| <b>Objetivos específicos</b> .....   | 10 |
| <b>MATERIAL Y METODOS</b> .....  | 11 |
| Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de medula ósea fetal bovina.....  | 11 |
| Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de tejido adiposo fetal bovino.....   | 11 |
| Aislamiento, cultivo y purificación de CS .....  | 12 |
| Preparación de monocapa de CS .....  | 13 |
| Co-cultivo de MSC-MO y MSC-TA con CS .....   | 13 |
| Q-PCR.....   | 14 |
| Inmunofluorescencia.....   | 16 |
| Citometría de flujo .....  | 16 |
| Análisis estadístico .....   | 17 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 18 |
| Caracterización morfológica de los cultivos de CS aislados desde parénquima testicular de toro .....   | 18 |
| Caracterización de la expresión de marcadores específicos para CS en cultivos aislados desde parénquima testicular de toro .....                               | 18 |
| Determinación del efecto del co-cultivo con CS sobre la diferenciación germinal <i>in vitro</i> de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.....                        | 20 |
| Morfología de MSC fetales bovinas en monocultivos.....   | 21 |
| Evaluación del efecto del co-cultivo con CS sobre la morfología <i>in vitro</i> de las MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.....                                    | 22 |
| Evaluación del efecto del co-cultivo con CS sobre la expresión de genes de pluripotencia y germinales en MSC fetales bovinas.....                              | 23 |
| <b>Evaluación del efecto del co-cultivo de MSC fetales bovinas con CS sobre la expresión de marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4 y germinal Dazl</b> ..... | 32 |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>Evaluación del efecto del co-cultivo de MSC fetales bovinas con CS sobre la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia.....</b> | <b>34</b> |
| <b>Discusión .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Conclusiones.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>44</b> |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Microfotografías de contraste de fase de cultivos de CS aislados desde parénquima testicular de toro.....  | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Análisis de citometría de flujo para determinación de la población de CS bovinas positiva al marcador específico WT1.....  | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Expresión de mRNA de WT1 y RA en cultivos de CS aislados desde parénquima testicular..   | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Microfotografías de contraste de fase de monocultivos de CS aislados desde parénquima testicular de toro y tratados con Mitomicina C.....                                | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Microfotografías de monocultivos de MSC aisladas desde tejido adiposo (MSC-TA) y médula ósea (MSC-MO) fetales bovinas..  | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Microfotografías de co-cultivos de MSC-TA y MSC-MO fetales bovinas con CS aisladas desde parénquima de toro.....   | 23 |
| <b>Figura 7.</b> Expresión de mRNA del gen de pluripotencia OCT4 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO.....  | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Expresión de mRNA del gen de pluripotencia NANOG en los días 7 y 14 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO.....  | 25 |
| <b>Figura 9.</b> Expresión de mRNA del gen germinal DAZL en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO .....   | 26 |
| <b>Figura 10.</b> Expresión de mRNA del gen germinal PIWIL2 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO.....   | 27 |
| <b>Figura 11.</b> Expresión de mRNA del gen mesenquimal CD73 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO.....  | 29 |
| <b>Figura 12.</b> Expresión de mRNA del gen mesenquimal CD105 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO.....   | 30 |
| <b>Figura 13.</b> Expresión de mRNA para el gen SCP3 en los días 14 y 21 de cultivo..   | 31 |
| <b>Figura 14.</b> Histogramas representativos de la población celular positiva a Nanog, Oct4 y Dazl en monocultivos y co-cultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS luego de 21 días de cultivo..... | 33 |
| <b>Figura 15.</b> Análisis de dot plot de citometría de flujo representativos de los marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en monocultivos y co-cultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS.....              | 34 |
| <b>Figura 16.</b> Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Wt1 en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo.....  | 35 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17.</b> Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Oct4 en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo.....  | 36 |
| <b>Figura 18.</b> Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Nanog en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo..... | 37 |
| <b>Figura 19.</b> Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Dazl en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo.....  | 38 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Secuencia de partidores utilizados en análisis de Q-PCR .....  | 15 |
| <b>Tabla 2.</b> Expresión de mRNA de OCT4 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo. ....          | 24 |
| <b>Tabla 3.</b> Expresión de mRNA de NANOG en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.....          | 25 |
| <b>Tabla 4.</b> Expresión de mRNA de DAZL en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.....           | 27 |
| <b>Tabla 5.</b> Expresión de mRNA de PIWIL2 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.....         | 28 |
| <b>Tabla 6.</b> Expresión de mRNA de CD73 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo. ....          | 29 |
| <b>Tabla 7.</b> Expresión de mRNA de CD105 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.....          | 31 |
| <b>Tabla 8.</b> Expresión de mRNA de SCP3 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo .....          | 32 |
| <b>Tabla 9.</b> Población celular en monocultivos y co-cultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS positivas a marcadores de pluripotencia Nanog, Oct4 y Dazl..... | 34 |

## RESUMEN

Las células madre mesenquimáticas (MSC) pueden ser candidatas adecuadas para la derivación de gametos *in vitro* debido a su abundancia y a su alto potencial de diferenciación. La diferenciación de las células germinales es un proceso complejo que requiere tanto de regulación endocrina y auto-paracrina en un entorno específico, como de interacciones directas celulares proporcionadas por las células somáticas del testículo. Las células de Sertoli (CS) juegan un papel esencial formando nichos para las células germinales y proporcionando factores esenciales para su diferenciación. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del co-cultivo de CS en la diferenciación de MSC derivadas de tejido adiposo (MSC-TA) y médula ósea (MSC-MO) fetales bovinas hacia linaje de células germinales. Las CS fueron aisladas desde parénquima de testículo de toro adulto y fueron caracterizadas mediante cuantificación de la expresión del biomarcador de CS, Wilms tumor 1 (WT1) y de los niveles de mRNA de Receptor de Andrógeno (AR) utilizando citometría de flujo (FC) y PCR cuantitativo (Q-PCR). Las MSC fueron aisladas desde tejido adiposo y médula ósea mediante adherencia al plástico y posteriormente fueron co-cultivadas sobre monocapas de CS durante 21 días. Muestras de cultivos celulares fueron obtenidas cada 7 días y analizadas para determinación de niveles de mRNA de genes endógenos  $\beta$ -ACTINA y GAPDH, genes de pluripotencia OCT4 y NANOG, genes germinales FRAGILIS, STELLA, VASA y genes germinales de macho DAZL, SRY, PIWIL2 y STRA8 mediante Q-PCR. Adicionalmente se evaluó la expresión de Dazl, Nanog y Oct4 mediante FC e IF. Una alta proporción ( $85,5\% \pm 5,5$ ) de CS fueron positivas para WT1. Los niveles mRNA DAZL y PIWIL2 aumentaron el día 14 de diferenciación en co-cultivos de MSC-TA/CS en comparación con los monocultivos y co-cultivos de MSC-MO/CS. Los niveles de mRNA de NANOG fueron activados en MSC-MO y MSC-TA co-cultivadas con CS luego de 7 y 14 días de cultivo. Los niveles de mRNA de OCT4 aumentaron ( $P < 0,05$ ) el día 14 en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/CS en comparación con los monocultivos. Los niveles de mRNA de CD73 aumentaron ( $P < 0,05$ ) en los co-cultivos el día 21 en comparación con los monocultivos de MSC-MO y MSC-TA, mientras los niveles de mRNA de CD105 disminuyeron ( $P < 0,05$ ) en el co-cultivo de MSC-TA/CS al día 21 en comparación con el monocultivos de MSC-TA. Adicionalmente, los niveles de mRNA de SCP3 disminuyeron ( $P < 0,05$ ) en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/CS el día 7 y 14 en comparación con el monocultivo de MSC-TA y no se detectó en el día 21. Los

patrones de expresión génica en los co-cultivos sugieren que las MSC fetales bovinas poseen potencial de diferenciación germinal y que las MSC-TA fetales bovinas tienen mayor capacidad de diferenciación en comparación a las MSC-MO. Considerando la disminución en la expresión de SCP3 en los co-cultivos, estos resultados sugieren que las MSC alcanzaron un estado de diferenciación germinal premeiótico temprano.

**Palabras clave:** Bovinos, Células madre mesenquimáticas, Célula germinal, Células de Sertoli.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) may be suitable candidates for *in vitro* gamete derivation due to their abundant source and wide differentiation potential. Germ cell differentiation requires endocrine and auto/paracrine regulation in a specific environment, as well as direct cell-to-cell interactions provided by the somatic cells of the testis. Sertoli cells (SC) play an essential role by forming niches and providing essential factors for germ cell differentiation. The aim of the present study was to evaluate the effect of co-culture of SC on the germ cell differentiation potential of bovine fetal MSC derived from adipose tissue (MSC-TA) and bone marrow (MSC-BM). Sertoli cells were isolated from bull testis parenchyma and characterized by quantification of biomarker wilms tumor 1 (WT1) expression and androgen receptor (AR) mRNA levels using flow-cytometry (FC) and quantitative-PCR (Q-PCR) analyses. bfMSC were isolated from adipose tissue and bone marrow and were co-cultured over monolayers of SC for 21 days. Cell culture samples were obtained every 7 days and analyzed for endogenous genes  $\beta$ -ACTIN y GAPDH, pluripotency genes OCT4 y NANOG, germinal genes FRAGILIS, STELLA, VASA and male germinal genes DAZL, SRY, PIWIL2 and STRA8 using Q-PCR. A high ( $P < 0.05$ ) proportion of SC ( $85,5\% \pm 5,5$ ) were positive for WT1 and expressed high levels of WT1 and AR mRNA levels. Levels of DAZL and PIWIL2 mRNA were up-regulated at day 14 of differentiation in bfMSC-SC co-cultures compared to monocultures and co-cultures of MSC-BM/CS. NANOG mRNA levels were activated in MSC-BM and MSC-TA co-cultured with SC at days 7 and 14 of culture. OCT4 mRNA levels increased ( $P < 0.05$ ) at day 14 in co-cultures of MSC-BM/CS and MSC-TA/CS compared to monocultures. CD73 mRNA levels increased ( $P < 0.05$ ) in the co-cultures at day 21. CD105 mRNA levels were decreased ( $P < 0.05$ ) in the co-culture of MSC-TA/CS at day 21 of culture compared to monoculture of MSC-TA. SCP3 mRNA levels were down-regulated in the co-cultures of MSC-BM/CS and of MSC-TA/CS at 14 day compared to monoculture and were not detected at day 21. Thus, the gene expression patterns in MSC suggest that they have the potential for germinal differentiation and that bfMSC-TA have greater differentiation capacity towards germinal lineage in relation to MSC-BM. Moreover, reduction in SCP3 mRNA throughout the process of germinal differentiation suggest that MSC achieved an early premeiotic germ cell differentiation state.

**Keywords:** Bovine, Mesenchymal stem cells, Germ cells, Sertoli Cells

## INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimáticas (MSC, del inglés Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells) son células multipotentes de morfología fibroblastoide, originadas desde la capa germinal mesodérmica embrionaria (Bydlowski et al., 2009). Las MSC se caracterizan por su capacidad de autorenovación o de división mitótica hacia progenie celular indiferenciada (Brooke et al., 2007). Estas células tienen capacidad de diferenciación hacia diversos tipos celulares de origen mesodérmico incluyendo osteocitos, condrocitos y adipocitos (Macías-Abraham et al., 2010). Además, participan en la mantención de la regeneración normal de órganos como sangre, piel o intestino y bajo condiciones *in vitro* pueden ser aisladas, cultivadas y transformadas en células especializadas con características compatibles con tipos celulares de diversos tejidos (Hernández Ramírez, 2011).

Las MSC pueden obtenerse desde una gran variedad de fuentes, incluyendo la médula ósea, el tejido adiposo y el cordón umbilical (Yalan et al., 2010). Dado su capacidad multipotencial, estas células pueden ser diferenciadas *in vitro* mediante exposición a señales químicas a través del estímulo de citoquinas y factores de crecimiento celular que permiten la activación y supresión de genes, dando lugar a células funcionales distintas a las de origen (Dueñas et al., 2014). Ejemplos de esto ha sido la producción *in vitro* de osteocitos, adipocitos, condrocitos, así como de miocitos y células similares a neuronas (Dueñas et al., 2014). Las MSC son una herramienta prometedora como terapia biológica para un amplio rango de patologías debido a sus múltiples ventajas que incluyen su fácil aislamiento y expansión en cultivo, multipotencia, efectos paracrinos, propiedades inmunomoduladoras y capacidad migratoria (Macías-Abraham et al., 2010). Estas propiedades hacen de las MSC una potencial herramienta para medicina regenerativa tanto para el trasplante de células indiferenciadas como para la utilización de células previamente diferenciadas (Harvanová et al., 2011).

Adicionalmente a su capacidad de diferenciación mesodérmica, en el último tiempo han existido reportes que indican que las MSC son capaces de diferenciarse hacia linajes celulares derivados de la capa endodérmica (hepatocito) y ectodérmica (neurona) (Dueñas et al., 2014). Esta capacidad conocida como plasticidad celular, ha sido sin embargo solo probada bajo condiciones *in vitro* (Dueñas et al., 2014). Por lo tanto, el potencial de diferenciación de las MSC es probablemente más amplio del conocido hasta



la actualidad. Hallazgos recientes sugieren que el potencial de diferenciación de las MSC es posible de dirigir hacia linaje de células germinales (GC) (Drusenheimer et al., 2007). Diversos experimentos en modelos murino (Xie et al., 2015), ovino (Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014) y humano (Hua et al. 2009) han demostrado la capacidad de las MSC para adquirir fenotipo germinal mediante la expresión de marcadores específicos. Este tipo de biotecnología permitiría potencialmente generar linaje germinal con capacidad de diferenciación funcional *in vitro* o *in vivo* hacia gametos en animales domésticos (Mouka et al., 2016).

La diferenciación germinal durante la embriogénesis es un proceso altamente coordinado y complejo que implica la liberación secuencial de factores celulares asociados a la proliferación y diferenciación celular (Costa, 2016). En animales domésticos, las GC masculinas se derivan desde células germinales primordiales (PGC) (Kostereva y Hofmann, 2008). La etapa de especificación de las PGC es inducida por factores extrínsecos secretados desde el ectodermo extraembrionario, incluyendo componentes de la vía de señalización asociada a la familia Sma y Mad (SMAD), la proteína morfogenética osea 4 (BMP4), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) (Surani et al., 2004) y la proteína de maduración inducida por linfocitos B 1 (BLIMP1) (McLaren y Lawson, 2005).

Adicionalmente al efecto de los factores extrínsecos, las células de Sertoli (CS) ejercen un rol fundamental en el proceso de diferenciación germinal (Monteiro et al., 2010). Estas células tienen diferentes funciones que involucran el control de la maduración y migración de células germinales, la síntesis de proteínas y esteroides implicados en el control del paso de secreciones entre el espacio tubular y los compartimentos intersticiales y la conformación de la barrera hematotesticular (Marina, 2003). Las CS proporcionan las condiciones para la progresión y la diferenciación celular durante la espermatogénesis, por lo que cualquier disfunción puede causar cambios en la diferenciación germinal y por consiguiente provocar infertilidad (Monteiro et al., 2010).

Aunque se ha obtenido considerables conocimientos sobre el desarrollo de células germinales en el ratón y muchos mecanismos están altamente conservados en mamíferos, sigue siendo necesario investigar directamente el proceso de diferenciación de las células germinales (Xie et al., 2015). Varios estudios han demostrado que las células madre embrionarias (CME) derivadas del macizo celular interno de blastocistos, pueden avanzar en el proceso de diferenciación germinal y que este proceso puede ser caracterizado

mediante análisis de marcadores germinales (Geijsen et al., 2004). En el caso de las células madre adultas (CMA), se ha reportado la diferenciación *in vitro* de MSC derivadas de cordón umbilical de humano hacia GC de macho (Xie et al. 2015). Estos autores utilizaron varias estrategias de diferenciación incluyendo un sistema de co-cultivo con CS. Un estudio reciente reportó la capacidad de las MSC derivadas de medula ósea (MSC-MO) ovinas para diferenciarse hacia GC mediante cultivo con BMP4, BMP8b o TGF $\beta$ 1 (Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014). Producto de esta exposición, las células fueron capaces de expresar genes de línea germinal como VASA o DDX4 (DEAD-box helicase 4, proteína de unión de ARN con helicasa dependiente de ARN), OCT4 (factor de transcripción 4 octámero vinculante) y DAZL (suprimido en azoospermia) (Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014).

La diferenciación germinal de MSC es un tipo de biotecnología reproductiva que ha estado orientada inicialmente a desarrollar protocolos que permitan producir gametos *in vitro* con el objetivo de tratar la infertilidad en humanos. Sin embargo, dado que este tipo de protocolos pueden ser adaptados a animales domésticos, es posible que puedan ser utilizados para producir espermatozoides *in vitro* para su utilización en mejoramiento genético de animales de producción y eventualmente para la conservación de especies en riesgo de extinción. De esa forma, el objetivo del presente trabajo es evaluar un sistema de co-cultivo de CS para inducir la diferenciación germinal de MSC fetales bovinas.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Características de las MSC

Las MSC se caracterizan morfológicamente por ser células pequeñas, largas y estrechas con pocos procesos celulares y que poseen un núcleo grande y redondo con un nucléolo prominente (Flores-Figueroa et al., 2006). Aunque fueron descritas como células similares a fibroblastos, su morfología puede variar según la fuente de obtención. Las MSC aisladas de sangre de cordón umbilical poseen en su mayoría un aspecto ovoide y en menor medida una morfología fibroblastoide. En contraste, las MSC aisladas desde medula ósea poseen un mayor grado de morfología fibroblastoide (Chang et al., 2006). Este aspecto morfológico es de gran importancia ya que podría tener relación con el inmunofenotipo celular (Rodríguez, 2005). Previamente se ha reportado que la población mesenquimal obtenida de sangre de cordón umbilical en su gran mayoría no expresa el antígeno CD90, mientras que en la población de origen medular este marcador es determinante en su identificación (Chang et al., 2006). En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (Internacional Society for Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir poblaciones de MSC humanas que incluyen: 1) adherencia a placas de cultivo de plástico; 2) expresión de antígenos mesenquimales como CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45 y 3) capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo *in vitro* (Dominichi et al., 2006).

### Fuentes tisulares de MSC

A pesar de que la MO ha sido tradicionalmente la fuente tisular más utilizada para el aislamiento de MSC, también ha sido reportado su aislamiento desde otros tejidos como adiposo (TA), cordón umbilical, fluido amniótico, pulpa dental, e incluso de sangre periférica, sugiriendo que las MSC se encuentran ampliamente distribuidas en los distintos tejidos (Vater et al., 2011). Aunque la MO es la fuente más conocida para la obtención de MSC, solo entre 0,001 a 0,0001% de las células mononucleares de MO humana son efectivamente MSC-MO y el resto corresponde principalmente a células hematopoyéticas, adipocitos y fibroblastos (Nardi y da Silva Meirelles, 2008). En los últimos años, el interés ha aumentado en el TA como fuente de MSC (MSC-TA) dada su

mayor abundancia y a que su obtención es menos invasiva comparada con la obtención desde MO (Vallée et al., 2009). Respecto al aislamiento y cultivo a partir de TA, las células obtenidas de esta fuente tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* similar a las obtenidas desde MO, aunque en algunas especies poseen una mayor capacidad de proliferación (Krampera et al., 2006).

#### Diferenciación germinal durante el desarrollo embrionario

Las PGC provienen del epiblasto embrionario, diferenciándose del resto de las células somáticas por efecto de señales emitidas por el ectodermo extraembrionario y endodermo visceral tempranamente (Nakamura y Seydoux, 2008). Las PGC posteriormente migran a través del intestino primitivo y mesenterio dorsal hasta llegar a las crestas genitales (Stevenson et al., 2016). En mamíferos no hay línea germinal evidente, sino que las GC son inducidas en el embrión, formándose en la región posterior del epiblasto, línea primitiva y alantoides (Saffman y Lasko, 1999). Tempranamente en el desarrollo embrionario, BMP4 y BMP8b inducen la capacidad de producir GC en el endodermo del saco vitelino y en respuesta a esta inducción, las PGC comienzan a expresar BLIMP1 también conocido como PRDN1 (dominio zinc iniciador de proteína 1) (Vincent et al., 2005). Esta proteína actúa como factor de transcripción encargado de silenciar el programa somático y activar el destino germinal (Vincent et al., 2005). Al mismo tiempo, las PGC comienzan a expresar los genes FRAGILIS (también conocido como IFITM1, o proteína de transmembrana inducida por interferón 1) y STELLA (también conocido como DPPA3 o asociada al desarrollo pluripotente 3), los cuales se encargan de determinar su carácter germinal (Lange et al., 2003). El gen SRY (región del cromosoma Y determinante del sexo) controla el desarrollo masculino en mamíferos por inducción de células somáticas de la cresta gonadal que se convertirán en los testículos (Rey, 2001). SRY es expresado en un pequeño grupo de células somáticas de las gónadas y conduce a estas células gonadales a convertirse en SC, la cuales son responsables del desarrollo sexual masculino de diversas formas, entre las que se encuentra el estímulo de la transformación de las PGC en espermatozoides (Monteiro et al., 2010). En 1948, Witchi demostró la presencia de PGC en el endodermo del saco vitelino, sitio extragonadal desde donde migraban hacia los primordios gonadales (Galdos-Riveros, 2010). Trabajos subsiguientes han caracterizado una línea de PGC que posiblemente se deriva de las células del epiblasto (Chuaire y Sánchez, 2014).

Posteriormente al establecimiento de las PGC, estas células migran hacia las gónadas, pero los mecanismos moleculares quimiotácticos son poco conocidos. Sin embargo, se plantea que factores como SCF (factor de células madre) y SDF-1 (factor-1 derivado del estroma) estarían relacionados con la quimiotaxis y anidación de las PGC en la gónada temprana bajo la estimulación de morfógenos como BMP4 (Dudley et al., 2010). La producción de factor determinante testicular (TDF) en las células que rodean a las PGC, en el día 7 después de la fecundación en el ratón, promueve la diferenciación de células que mantienen sus capacidades de auto renovación, siendo denominadas como células troncales o CMA. Las CMA presentan un repertorio de diferenciación restringido dentro de una línea celular definida, con una capacidad limitada de diferenciación hacia algunos tipos celulares y por lo tanto se les denominan progenitores multipotentes, sin embargo, bajo ciertas condiciones de cultivo celular, estas restricciones pueden ser liberadas (Dudley et al., 2010).

Las PGC son los precursores de los oogonias y espermatogonias y se caracterizan por ser las únicas células capaces de retener la capacidad de desarrollo pluripotencial luego de la gastrulación (Stevenson et al., 2016). Las PGC tienen una variada morfología y expresión génica, por lo tanto, presentan distintos marcadores según el estadio en el que se encuentran, siendo los más estudiados y caracterizados FRAGILLIS, C-KIT, STELLA, DAZ, VASA, BLIMP 1 (Costa, 2016). Adicionalmente, se ha reportado que el silenciamiento del gen NANOG es esencial para la maduración de las PGC en la cresta genital durante el desarrollo embrionario, esto es, la maduración de las Células Madre Germinales (CMG) a partir de PGC (Chambers et al., 2007). En tanto las PGC que se establecen en las gónadas, comienzan a diferenciarse a CMG, las cuales se dividen por mitosis para producir los gametos. Las CMG son conocidas como espermatogonias A en el macho, y poseen capacidad de auto-renovación y de diferenciación hacia espermatogonias intermedias, predestinadas a diferenciarse en espermatozoides (Chambers et al., 2007). En los machos, las GC se detienen en la etapa G0/G1 del ciclo celular mitótico y la meiosis no se inicia hasta después del nacimiento, por lo tanto, en machos y hembras, en el inicio de la meiosis participa gen STRA8 (estimulado por ácido retinoico) (Koubova et al., 2006). El AR es provisto por el mesonefros en ambos sexos a los 13,5 días post coito (dpc) en el ratón; sin embargo, en testículo la meiosis es retardada por la acción de la enzima que degrada al AR conocida como CYP26B1 (proteína que codifica para el citocromo P450) (Campos y Germán, 2010).

## Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso biológico complejo que requiere la diferenciación continua y la renovación de las células germinales. Es el proceso por el cual las células se transforman produciendo GC haploides a partir de las CMG diploides (Hess y de Franca, 2009). Una vez que las PGC llegan a la cresta gonadal de un embrión macho, se incorporan en los cordones sexuales, permaneciendo allí hasta la pubertad, momento en cual comienza la formación de túbulos seminíferos y el epitelio se diferencia hacia CS (Zhao et al., 1996).

La espermatogénesis se divide en tres fases principales: proliferativa, meiosis y espermiogénesis, pasos consecutivos que se inician con la división de las espermatogonias y finalizan con la formación de espermatozoides maduros (Sutovsky y Manandhar, 2006). El comienzo de la espermatogénesis durante la pubertad probablemente está regulado por la síntesis de BMP8b por parte de la espermatogonia, como ha sido evidenciado en ratones que carecen de BMP8b y que no inician espermatogénesis en la pubertad (Zhao et al., 1996). El epitelio seminífero está compuesto por dos clases de células en el adulto: las CS y las GC en diferentes fases de su desarrollo. Las GC espermatogénicas se unen a las SC mediante moléculas de cadherina-N que se adhieren a ambas superficies celulares y por moléculas de galactosiltransferasa que se unen a su receptor de carbohidrato sobre las CS (Merina, 2003). Las SC nutren y protegen a las células espermáticas en el proceso de diferenciación durante la espermatogénesis (García et al., 2012). Las GC se localizan alrededor de la lámina basal, donde proliferan continuamente desde el límite externo de los túbulos seminíferos (Merina, 2003). Algunos de los genes que regulan la espermatogénesis se han conservado a lo largo de la evolución desde las moscas hasta los seres humanos (Yen et al., 1997). El gen DAZL codifica una proteína de unión a RNA localizada en el cromosoma Y, pero esta proteína no está presente en hombres infértiles, como consecuencia se observa incapacidad de producción espermática (Saxena et al., 2000). Las proteínas de unión a ARN son especialmente importantes en la espermatogénesis porque muchos de los genes expresados en la línea espermática están regulados a nivel de la traducción del ADN (Saunders et al., 2003).

## Rol de las CS durante la espermatogénesis

Los procesos que ocurren durante la espermatogénesis y que incluyen mitosis, meiosis, espermiogénesis y espermiación, deben suceder en coordinación con las CS que forman un microambiente que permite sostener el proceso de mantención de la pluripotencia y el proceso de diferenciación (Visintin, 2013). Estudios previos han demostrado que un sistema de co-cultivo MSC-CS en humanos es capaz de imitar el microambiente nativo para la colonización de GC *in vitro* y por lo tanto puede utilizarse para explorar los mecanismos que controlan la diferenciación de GC desde MSC en machos (Xie et al., 2015) Este proceso ha sido estudiado principalmente mediante el análisis de la expresión de marcadores de células germinales tempranos como STELLA y VASA y del marcador DAZL en GC masculinas derivadas de MSC diferenciadas (Xie et al., 2015). Las CS producen citoquinas esenciales y sirven como células de sustento en el proceso de espermatogénesis (Xie et al., 2015). Esta actividad se realiza mediante la formación de uniones estrechas que estructuran la barrera hemato-testicular, la cual actúa como filtro seleccionando los compuestos plasmáticos útiles para la espermatogénesis y evitando la difusión de autoantígenos del interior del túbulo a la sangre (Huleihel y Lunenfeld, 2004). Las CS producen además la proteína ligadora de andrógenos (ABP) que media el transporte de la testosterona hasta los túbulos seminíferos, donde estimula el desarrollo y diferenciación de las células de la línea germinal, principalmente en las etapas donde se observan la meiosis y la diferenciación de las espermatidas a espermatozoides (Ruwanpura et al., 2010).

Por otra parte, las CS producen el factor neural derivado de células gliales (GDNF), el cual funciona como promotor de espermatogonias indiferenciadas y asegura la auto renovación de células madre esprmatogoniales (CME) durante el periodo prenatal (Alves et a., 2013). Estudios recientes han demostrado que las CS también promueven la proliferación de células madre endoteliales y neurales en co-cultivo mediante la producción de citoquinas, como el factor de crecimiento epitelial y la interleuquina-6 (IL-6) (Fan et al., 2011). La proliferación de las CS continua hasta la pubertad y en la edad adulta tienen un papel nutritivo, fagocitario y sustentador de la espermatogénesis (Monteiro et al., 2010).

## Diferenciación germinal de las MSC

Las MSC son una fuente novedosa de progenitores multipotentes que pueden diferenciarse hacia linajes celulares derivados de las líneas primitivas germinales a través del proceso de transdiferenciación (Wei et al., 2012). Recientemente se ha reportado que MSC-MO ovinas cultivadas con factores de crecimiento como BMP4, BMP8 y TGF $\beta$  pueden expresar genes germinales como VASA, OCT4 y DAZL (Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014). Así mismo, la exposición de MSC-MO humanas a AR induce la expresión de marcadores precoces de células germinales como OCT4, STELLA, NANOG y VASA, además de marcadores de GC de macho como DAZL, c-kit y STRA8 (Hua et al. 2009). Por otra parte, estudios previos utilizando MSC derivadas de cordón umbilical de ratón han reportado el potencial de diferenciación de estas células hacia linaje germinal utilizando un sistema de co-cultivo con CS (Xie et al., 2015). Estos autores describen la formación de agrupaciones de MSC similares a las de monocapa de SC después de 21 días, formando colonias redondas que comparten características morfológicas de las colonias espermatogoniales y que expresan marcadores de células germinales tempranas como STELLA y VASA y el marcador DAZL de GC masculinas. Estos resultados muestran que la diferenciación de las MSC hacia linaje germinal está sujeta a una serie de condiciones de diferenciación que puede incluir la presencia de CS. En consecuencia, dada la relevancia de las CS durante el proceso de diferenciación germinal es que el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del co-cultivo de SC sobre el potencial de diferenciación germinal de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.



## **Hipótesis**

El cultivo *in vitro* de MSC derivadas de tejidos fetales bovinos bajo la interacción con CS induce su diferenciación hacia células germinales de macho. Las subpoblaciones de células germinales masculinas diferenciadas pueden realizar meiosis.

## **Objetivo general**

Evaluar el efecto del co-cultivo de CS sobre el potencial de diferenciación germinal de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.

## **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto del co-cultivo de CS sobre la diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.
2. Comparar el potencial de diferenciación germinal entre MSC-MO y MSC-TA en un sistema de co-cultivo *in vitro* con CS.
3. Evaluar el potencial de progresión meiótica de MSC-MO y MSC-TA luego del proceso de diferenciación germinal en un sistema de co-cultivo *in vitro* con CS.

## MATERIAL Y METODOS

### Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de medula ósea fetal bovina

Las MSC-MO fueron aisladas desde tejidos obtenidos de fetos bovinos (N=6) de 8-9 meses de gestación provenientes de una planta faenadora. Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico al Laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria (LACIV) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los fémures fetales fueron separados de tejidos blandos y seccionados en la diáfisis utilizando una sierra. Posteriormente se realizó una aspiración de MO mediante una aguja de 18 G conectada a una jeringa de 10 mL con medio de colección (DMEM alto en glucosa 4,5 gr/L; GIBCO, Grand Island, USA) suplementado con 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina (Corning). Las MSC se aislaron mediante un protocolo descrito previamente (Bosnakovski et al., 2005). Brevemente, el aspirado de MO se centrifugó dos veces en medio de colección y dos veces en PBS (pH 7,4; Hyclone Laboratories, Utah, USA) a 300 x g por 5 min. Una vez lavado, el pellet se aspiró y se suspendió en medio de expansión el cual consistía en DMEM alto en glucosa (4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado con 10% de SFB (Hyclone Laboratories), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina, en botellas de cultivo T75 (Falcon, New Jersey, USA) y posteriormente se incubó a 38°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de dos días las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia, las células fueron sometidas a pasaje mediante incubación en 0,5% de tripsina/EDTA (Hyclone Laboratories).

### Aislamiento y cultivo de MSC derivadas de tejido adiposo fetal bovino

Las MSC-TA fueron aisladas desde tejidos obtenidos desde los mismos fetos bovinos (N=6) de 8-9 meses de gestación provenientes de una planta faenadora. Se aislaron aproximadamente 10 g de TA desde el omento mayor fetal, bajo condiciones de asepsia y el tejido fue depositado en un tubo de 20 mL de PBS suplementado con 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina. Posteriormente, el TA fue lavado 3 veces en PBS y luego fue disgregado utilizando una tijera e incubado en 0,5% de

colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) diluida en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (1mL/g de tejido adiposo) durante 45 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La colagenasa I fue neutralizada mediante la adición de igual volumen de DMEM suplementado con 10% de SFB. El tejido disgregado fue filtrado a través de poros de 40 µm y posteriormente centrifugado a 770 x g. El pellet de células fue suspendido en medio de expansión el cual consistió en DMEM alto en glucosa (4500 mg/L D-Glucosa; Hyclone Laboratories) suplementado con 10% de SFB (Hyclone Laboratories), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina, en botellas de cultivo T75 (Falcon, New Jersey, USA) e incubado a 38°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de dos días, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia, las células fueron sometidas a pasaje mediante incubación en 0,5% de tripsina/EDTA (Hyclone Laboratories).

#### Aislamiento, cultivo y purificación de CS

Los cultivos primarios de CS fueron preparados a partir de tejido testicular de toro adulto por digestión enzimática secuencial como ha sido descrito previamente (Aslam et al., 1998). La digestión fue realizada en medio DMEM-F12 con L-Glutamina (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12), suplementado con 2 mg/mL de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) y 2 mg/mL de DNase I (Cat.# 10104159001, Sigma Aldrich). La reacción de digestión fue detenida mediante la adición de medio DMEM-F12, suplementado con 10% SFB, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Corning) y 100 µg/mL de anfotericina B. Posteriormente, la suspensión celular fue centrifugada a 500 x g durante 10 min a 4°C y el sedimento fue filtrado con un filtro de malla de 100 µm (Corning). Las células fueron divididas en alícuotas y sembradas en placas de cultivo de P100 con medio de cultivo de CS que consistió en DMEM-F12 suplementado con 10% SFB, 100 µg/mL de anfotericina B, 100 µg/mL de estreptomina y 100 UI/mL de penicilina (Sigma). Los cultivos de CS fueron posteriormente incubados a 38 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de una hora se eliminó el sobrenadante que contiene GC y las células adherentes al plástico fueron lavadas dos veces con PBS y posteriormente cultivadas en medio fresco. Para obtener cultivos de CS con una pureza mayor al 95%, luego de 48 horas, los cultivos fueron tratados hipotónicamente con Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) durante 2,5 minutos para lisar GC

residuales. Posteriormente las placas fueron lavadas dos veces con PBS, y luego de cambio de medio se cultivó en 5% de CO<sub>2</sub> a 38°C. Cuando las células adherentes alcanzaron una confluencia del 80 al 90%, fueron despegadas con tripsina y transferidas a nuevas placas para expansión y eliminación de GC residuales. Durante el cultivo, las GC no adherentes a las placas de cultivo fueron eliminadas mediante lavados repetidos. Para los experimentos posteriores se utilizaron cultivos de CS sin GC. Las características morfológicas de CS fueron examinadas mediante microscopía de contraste de fase.

#### Preparación de monocapa de CS

Las CS fueron despegadas utilizando tripsina/EDTA, contadas utilizando un hemocitómetro y sembradas a una concentración de  $0,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> para generación de una monocapa adherente en placas de cultivo a 38 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. El medio se reemplazó cada 2 días y las células fueran cultivadas durante 2 días adicionales para formar una monocapa alimentadora confluyente. Los cultivos de CS de pasaje 2-5 con 80 a 90% de confluencia fueron previamente incubados con 16 ng/mL de mitomicina C (Cat.# 10107409001 Sigma-Aldrich, EP) a 38 °C durante 2 horas para detener la mitosis y posteriormente se lavaron tres veces con PBS para eliminar residuos de mitomicina C.

#### Co-cultivo de MSC-MO y MSC-TA con CS

La suspensión MSC-MO o MSC-TA fue sembrada en una concentración de  $0,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> sobre la monocapa de CS, previamente tratada con mitomicina C por 2 horas. Las MSC-MO y MSC-TA fueron co-cultivadas con CS en una proporción de 1:1. El cambio de medio se realizó en días alternados. Después de 1 a 3 semanas, ambos tipos celulares co-cultivados (MSC y CS) fueron fijados en buffer de lisis suplementado con 2% de β-Mercaptoetanol para análisis por PCR-cuantitativo (Q-PCR) o fijadas en paraformaldehído 4% para análisis por Citometría de flujo (CF) y/o en metanol para análisis por inmunofluorescencia. Las microfotografías fueron tomadas bajo un microscopio invertido cada 7 días durante el período de cultivo de 3 semanas.

## Q-PCR

La cuantificación de la expresión de mRNA de los genes endógenos GAPDH,  $\beta$ -ACTINA, genes de pluripotencia OCT4, NANOG, genes germinales FRAGILIS, STELLA, VASA y genes germinales de macho DAZL, SRY, PIWIL2 y STRA8 (Tabla 1) fueron determinados mediante Q-PCR. Se extrajo RNA total de las células utilizando un kit RNaseasy (Qiagen, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado utilizando un Qubit 3.0 (Fluorometer, CA, USA). La digestión del DNA genómico fue realizada mediante un kit DNase I (Thermo Scientific, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado y amplificado mediante un kit Affinity Script Q-PCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, CA, USA), utilizando un termociclador Step One (Applied Biosystems, CA, USA). La reacción de PCR fue realizada utilizando un kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, CA, USA) y un termociclador Eco Real-Time PCR System (Illumina, CA, USA). Cada tubo de reacción consistió en: 5  $\mu$ L de Sybr Green, 1  $\mu$ L de primer Forward, 1  $\mu$ L de primer Reverse, 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 5ng de cDNA. La amplificación del cDNA se extendió por 40 ciclos y el análisis de expresión relativa fue realizada utilizando el método  $\Delta\Delta$ Ct (Ct: Threshold Value) (Vandesompele et al., 2002).

**Tabla 1.** Secuencia de partidores utilizados en análisis de Q-PCR

| <b>Genes</b>                  | <b>Secuencia de nucleotidos (5'-3')</b>                               | <b>Nº de acceso</b> |
|-------------------------------|---|---------------------|
| <b>Genes Endogenos</b>        |   |                     |
| B-<br>ACTINA                  | For. CGCACCCTGGCATTGTCAT<br>Rev. TCCAAGGCGACGTAGCAGAG                 | NM_173979.3         |
| GAPDH                         | For. CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA<br>Rev. TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG | NM_001034034.2      |
| <b>Genes de Pluripotencia</b> |   |                     |
| OCT4                          | For. GAAAGAGAAAGCGGACGA<br>Rev. GTGAAAGGAGACCCAGCA                    | NM_174580.3         |
| NANOG                         | For. TAAGCACAGGGGGCAAAGT<br>Rev. ATGGCTAAAAGGGGTGGAGG                 | NM_001025344.1      |
| <b>Genes Germinales</b>       |   |                     |
| AR                            | For. CAGATGGCAGTCATTCAG<br>Rev. CTTGGTGAGCTGGTAGAAG                   | NM_001244127.1      |
| SRY                           | For. AATAAGCACAAGAAAGTCCAGG<br>Rev. CAAAAGGAGCATCACAGCAG              | XM_015465855.1      |
| WT1                           | For. TACCAGATGACCTCCCAACT<br>Rev. TCTGCCCTTCTGTCCATTTC                | XM_015466596.1      |
| PIWIL2                        | For. TCGTATTGATGATGTGGATTGG<br>Rev. GGGAGCAGCAGGATTTAC                | XM_015464593.1      |
| FRAGILIS<br>2                 | For. ACCTTCCTTGGTGGCTTTG<br>Rev. TCACAGACAAGGGTGCTTTATT               | NM_001078142        |
| DAZL                          | For. TCCAAGTTCACCAGTTCAGG<br>Rev. CGTCTGTATGCTTCTGTCCAC               | NM_001081725.1      |
| <b>Gene de Meiosis</b>        |   |                     |
| SCP3                          | For. GCTGGAAAGATTTGGAGCTG<br>Rev. ATCCCACTGCTGGAACAAAG                | BC102433            |
| <b>Genes Mesenquimaticos</b>  |   |                     |
| CD73                          | For. TGGTCCAGGCCTATGCTTTTG<br>Rev. GGGATGCTGCTGTTGAGAAGAA             | NM_174129.3         |
| CD105                         | For. CGGACAGTGACCGTGAAGTTG<br>Rev. TGTTGTGGTTGGCCTCGATTA              | NM_00107639.1       |

## Inmunofluorescencia

La expresión de marcadores de CS Wt1, de pluripotencia Oct4 y Nanog y del marcador germinal Dazl fue detectada en MSC-MO y MSC-TA diferenciadas mediante inmunofluorescencia (IF) en el día 14 de cultivo. Los monocultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS y las MSC-TA y MSC-MO co-cultivadas con CS fueron fijados en placas de 12 pocillos utilizando metanol a -20 °C por 20 min. Posteriormente las células fueron lavadas y bloqueadas con 2% albumina sérica bovina (BSA) diluida en PBS (pH: 7,4) por 30 minutos. Los marcadores fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos policlona de conejo anti-Wt1 (Cat # ARP37989-P050, Aviva systems biology, USA) policlona de cabra anti-Oct4 (Santa Cruz, CA, USA), policlona de cabra anti-Nanog (Santa Cruz, CA, USA) y policlona de conejo anti-DazL (Cat # ab34139, Abcam, USA), todos reactivos a bovino respectivamente, diluidos en 2% BSA diluida en PBS (pH: 7,4) (Wt1, 1:200; Oct4, Nanog, Dazl, 1:50). La incubación con anticuerpos primarios fue realizada durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las MSC fueron lavadas una vez con PBS y dos veces con 2% BSA diluida en PBS (pH: 7,4) e incubadas en anticuerpo secundario IgG anti-cabra conjugado con FITC (Santa Cruz), IgG anti-conejo conjugado con FITC (abcam, USA) diluido en 10%PBS con BSA2% (1:600) por 1hora. A continuación, las MSC fueron lavadas nuevamente dos veces con 2% BSA diluida en PBS (pH: 7,4) y una vez con agua destilada y posteriormente fueron montadas en medio con DAPI Vectashield (Cat # H-1200, CA, USA). Una vez finalizado el protocolo, las muestras fueran guardadas a 4 °C y protegidas de la luz. Las muestras fueran fotografiadas utilizando un microscopio de epifluorescencia y un microscopio confocal espectral NIKON con cámara fotográfica conectada a un computador.

## Citometría de flujo

La cuantificación de la población de CS positiva a WT1 y de MSC-TA y MSC-MO diferenciadas positiva a marcadores de pluripotencia (OCT4 y NANOG) y germinal de macho (DAZL), fue realizada mediante citometría de flujo (FC). Las células fueron removidas de las placas de cultivo utilizando tripsina al 0,25% en 0.1% de EDTA durante 5-10 minutos a 38°C y posteriormente fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 1800 rpm por 5 min. Luego las células fueron incubadas en una solución de bloqueo (3% BSA diluida en PBS pH: 7,4 con 1,5 mg/mL glicina por 30 minutos a 37°C. Las CS, MSC y

co-cultivos fueron incubados con anticuerpos policlonales de conejo anti-Wt1, anti-Oct4, anti-Nanog y anti-Dazl bovino respectivamente, diluidos en PBS pH: 7,4 con 2% BSA (Wt1, 1:200; Oct4, Nanog, Dazl, 1:50) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las SC, MSC y co-cultivos fueron lavados con 0,1% tween diluído en PBS (pH: 7,4), centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e incubadas en anticuerpo secundario FITC-Goat IgG, (Cat. # ab9705, Abcam, EUA) diluido en PBS con BSA (1:1000) por 2 horas a 37 °C. Después de los lavados con PBS, el pellet fue resuspendido en buffer para CF, Isoflow seath fluid (Cat. # 8546859, Beckman Coulter, CA, USA) y analizado con FACS citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) utilizando luz láser 525 nm (verde). El contenido de ADN de las células fue cuantificado mediante tinción de Ioduro de Propíidio.

#### Análisis estadístico

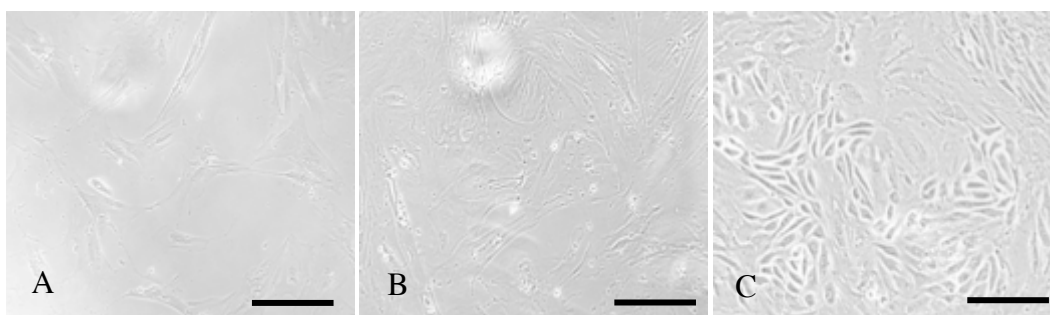
Los datos de expresión génica obtenidos desde tres repeticiones fueron expresados como media y desviación estándar. El modelo estadístico consideró como variables dependientes la expresión relativa de los genes y la proporción de células positivas a los marcadores, mientras que las variables independientes fueron los días de cultivo, el tipo de tratamiento (monocultivo y co-cultivo) y la interacción entre variables. Se utilizó un valor de significancia de  $P < 0.05$ . Se utilizó la prueba de Shapiro Wilks para evaluar la distribución normal de los datos. Los valores de expresión relativa de los genes y los de proporción de células positivas a los marcadores fueron analizados por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios para días de cultivo y tratamientos fueron determinadas utilizando el post Test de Duncan. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Info Stat (Cordoba, Argentina, 2008).



## RESULTADOS

### Caracterización morfológica de los cultivos de CS aislados desde parénquima testicular de toro

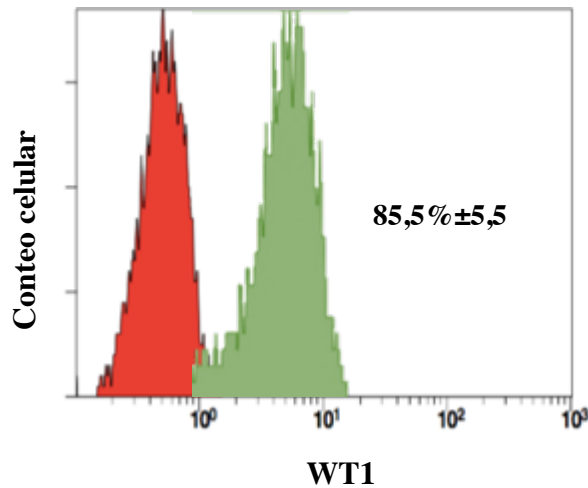
Las CS fueron aisladas desde parénquima testicular de toro mediante digestión mecánica y enzimática. Los cultivos de CS aislados fueron cultivados durante 10 días y evaluados morfológicamente mediante microscopía de contraste de fase. La adhesión celular fue alcanzada 1 hora posterior a la siembra y las GC no adherentes fueron eliminadas mediante incubación con Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) (Figura 1A). Luego de 1-3 pasajes, las CS formaron una monocapa de células grandes, con formato irregular fibroblastoide con núcleo triangular u ovoide (Figura 1B). A medida que las células se hicieron más confluyentes, distintas agrupaciones de células fueron observadas y luego de 1 semana de cultivo la presencia de GC no fue detectada (Figura 1C).



**Figura 1.** Microfotografías de contraste de fase de cultivos de CS aislados desde parénquima testicular de toro. Los cultivos de CS aislados se caracterizaron por poseer una morfología irregular fibroblastoide, con núcleo triangular u ovoide desde el día 2 (A) hasta el día 5 (B) de cultivo. Posteriormente, los cultivos se caracterizaron por la formación de colonias confluyentes el día 10 (C) de cultivo. Barra de escala = 100µm.

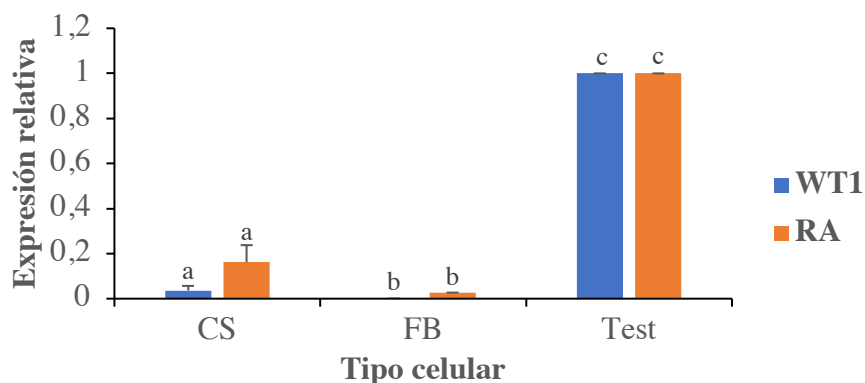
### Caracterización de la expresión de marcadores específicos para CS en cultivos aislados desde parénquima testicular de toro

La inmunodetección de antígenos específicos de CS, WT1 y RA se realizó mediante citometría de flujo en células de pasajes 3-5 con el objetivo de determinar la homogeneidad de los cultivos. Se determinó que la mayoría ( $85,5\% \pm 5,5$ ;  $P < 0,05$ ) de las células eran positivas a WT1 (Figura 2).



**Figura 2.** Análisis de citometría de flujo para determinación de la población de CS bovinas positiva al marcador específico WT1. Los niveles de autofluorescencia (área roja) fueron incorporados dentro de la primera década de fluorescencia. La mayoría (85,5% ± 5,5;  $P < 0,05$ ) de la población de CS fue positiva a WT1 (área verde). Abreviaciones: WT1(Wilm's tomour 1).

Adicionalmente, los niveles de mRNA de los marcadores de CS, WT1 y RA fueron cuantificados mediante análisis de Q-PCR en cultivos celulares aislados desde parénquima testicular. El análisis detectó un mayor nivel de mRNA de WT1 en cultivos de CS comparando con niveles de mRNA no detectables en fibroblastos (0,036 veces la expresión en testículo;  $P < 0,05$ ). En forma similar, los niveles de mRNA de RA fueron mayores en CS comparado con fibroblastos (0,16 versus 0,02 veces la expresión en testículo, respectivamente;  $P < 0,05$ ) (Figura 3).

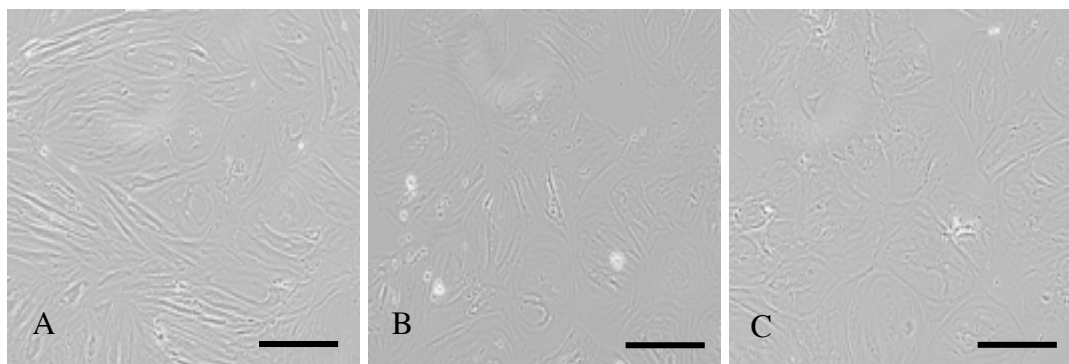


**Figura 3.** Expresión de mRNA de WT1 y RA en cultivos de CS aislados desde parénquima testicular. Los niveles de WT1 y RA fueron mayores ( $P < 0,05$ ) en CS comparado con fibroblastos pero menores ( $P < 0,05$ ) en ambos tipos comparado con testículo (control positivo). Abreviaciones: CS (células de Sertoli), FB (fibroblasto) y Test (Testículo). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tipos celulares.

#### **Determinación del efecto del co-cultivo con CS sobre la diferenciación germinal *in vitro* de MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas.**

Morfología de las CS tratadas con mitomicina C y cultivadas durante 21 días.

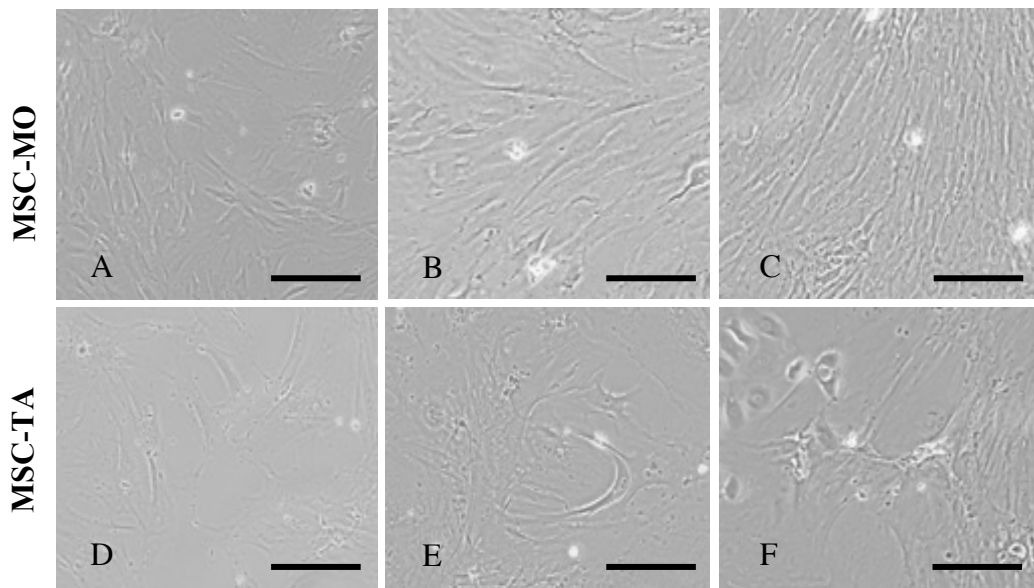
Luego de 10 días de siembra en pasaje 3-5, las CS fueron sembradas a una concentración de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y/o 75 cm<sup>2</sup> en DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de SFB. Luego de 2 días, se observó la formación de una monocapa adherente, estado en el cual las células fueron tratadas con mitomicina C para detener la proliferación. Las células presentaron una morfología irregular con núcleo grande, con formato variable entre triangular, redondeada u ovalada, morfología diferente a las colonias sin tratamiento con mitomicina C (Figura 4).



**Figura 4.** Microfotografías de contraste de fase de monocultivos de CS aislados desde parénquima testicular de toro y tratados con Mitomicina. Los cultivos de CS aislados se caracterizaron por poseer monocapas confluyentes de células con morfología irregular desde el día 2 (A), 7 (B) hasta el día 21 (C) de cultivo. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

#### Morfología de MSC fetales bovinas en monocultivos

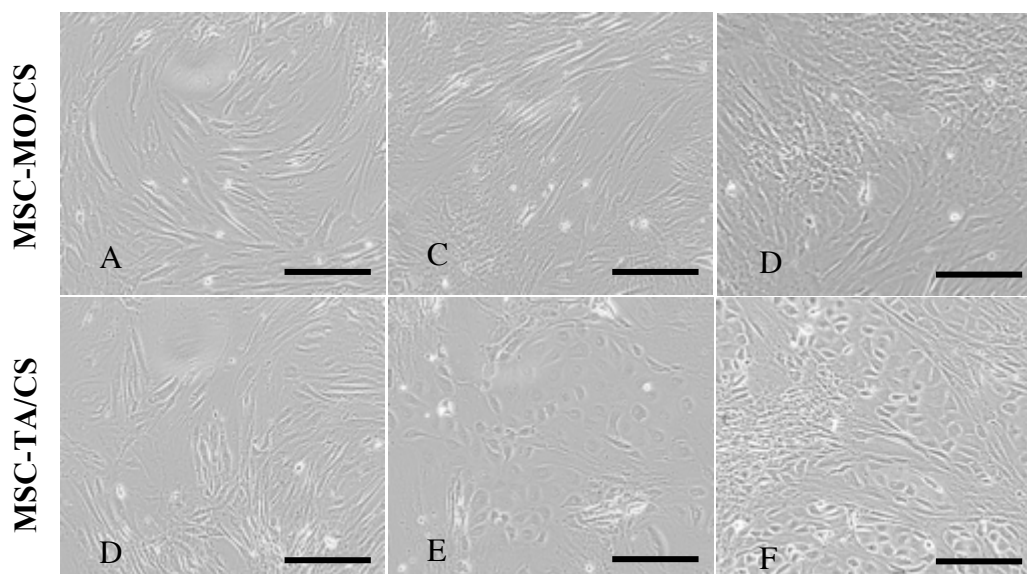
Las MSC-MO fueron derivadas desde la cavidad medular del fémur fetal y las MSC-TA desde el omento fetal bovino. Posteriormente las células fueron aisladas en base a su capacidad de adherencia al plástico y a su morfología fibroblastoide. Las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante sucesivos lavados o cambios de medio. Las MSC-MO y MSC-TA de pasaje 3- 5 fueron sembradas en una concentración de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y/o 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de SFB. Se detectó la proliferación de las MSC-MO mediante aumento de la confluencia desde el día 7 a 21 (Figura 5). Estas células presentaron una morfología fibroblastoide alargada y heterogénea que se mantuvo durante el periodo de cultivo. En contraste, las MSC-TA presentaron subpoblaciones con morfología fibroblastoide y otras subpoblaciones circulares con núcleos grandes de forma triangular u ovalada.



**Figura 5.** Microfotografías de monocultivos de MSC aisladas desde tejido adiposo (MSC-TA) y medula ósea (MSC-MO) fetales bovinas. Los cultivos de MSC-MO aumentaron de confluencia desde el día 0 (A), el día 7 (B), hasta al día 21 (C) sin presentar cambios relevantes en la morfología fibroblastoide alargada. Los cultivos de MSC-TA aumentaron su confluencia desde el día 0 (D), el día 7 (E) hasta el día 21 (F) y desde el día 14 a 21, se pudo observar la presencia de células grandes redondeadas. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

#### Evaluación del efecto del co-cultivo con CS sobre la morfología *in vitro* de las MSC-MO y MSC-TA fetales bovinas

Las MSC-MO y MSC-TA aisladas fueron sembradas en una proporción 1:1 sobre capas alimentadoras de CS luego de 24 horas de ser tratadas con mitomicina C. Las MSC-TA transferidas, se extendieron sobre la monocapa de CS y experimentaron cambios morfológicos desde un aspecto fibroblastoide elongado hacia una forma más redondeada y cuboidal. Luego de dos semanas de siembra, las MSC-TA perdieron su forma fibroblastoide similar a un huso y se agruparon en colonias pequeñas circundadas por células con morfología similar a CS. En el co-cultivo de MSC-MO/CS se pudo observar un aumento en la proliferación celular alcanzando confluencia y formando agregados celulares hasta el día 21 de cultivo (Figuras 6).

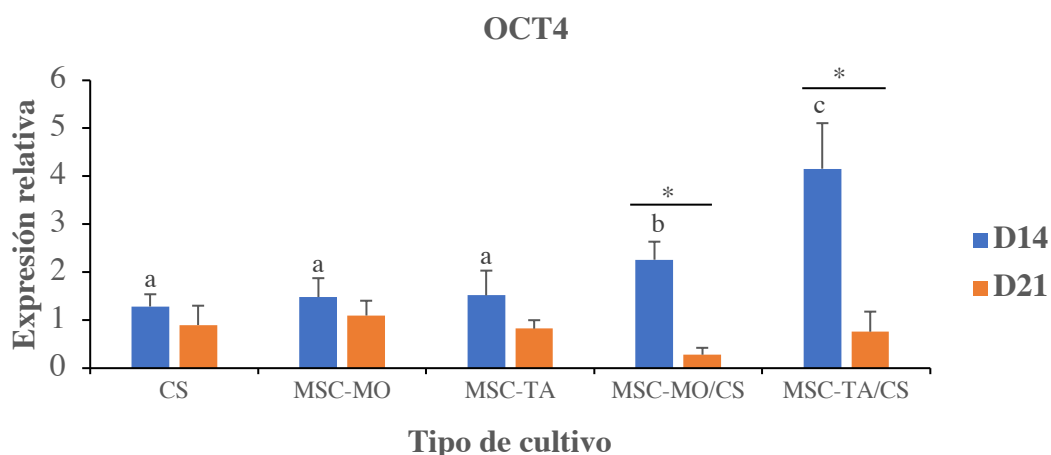


**Figura 6.** Microfotografías de co-cultivos de MSC-TA y MSC-MO fetales bovinas con CS aisladas desde parénquima de toro. Los co-cultivos de MSC-MO/CS presentaron un aumento de la confluencia con mantención de la morfología fibroblastoide desde el día 7 (A), el día 14 (B) hasta el día 21 (C). Los co-cultivos MSC-TA/CS se caracterizaron por presentar morfología fibroblastoide hasta el día 7 de cultivo (D) y posteriormente por la aparición de colonias de células redondas rodeadas por células con morfología similar a CS desde el día 14 (E) hasta el día 21 (F). Barra de escala = 100  $\mu$ m.

Evaluación del efecto del co-cultivo con CS sobre la expresión de genes de pluripotencia y germinales en MSC fetales bovinas

Se aislaron muestras celulares desde los co-cultivos de MSC-TA/CS y MSC-MO/CS de los días 0, 7, 14 y 21 con el objetivo de cuantificar la expresión de mRNA de los marcadores de pluripotencia OCT4 y NANOG, germinales tempranos FRAGILIS2, DAZL germinales de macho, VASA, SRY, PIWILL2 y de meiosis SCP3, Además, se evaluó la expresión de mRNA de los marcadores mesenquimáticos CD73 y CD105.

La expresión de mRNA de OCT4 fué mayor ( $P < 0,05$ ) en co-cultivo de MSC-TA/CS ( $4,16 \pm 0,95$ ) y en co-cultivo de MSC-MO/CS ( $2,26 \pm 0,38$ ) el día 14 de cultivos en comparación con los monocultivos del día 14 y del día 21 de cultivo (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión de mRNA del gen de pluripotencia OCT4 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO. La expresión de mRNA de OCT4 fué mayor ( $P<0,05$ ) en los co-cultivos de MSC-TA/CS y MSC-MO/CS al día 14 de cultivo en comparación con los monocultivos en día 14 y los monocultivos y co-cultivos del día 21. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P<0,05$ ).

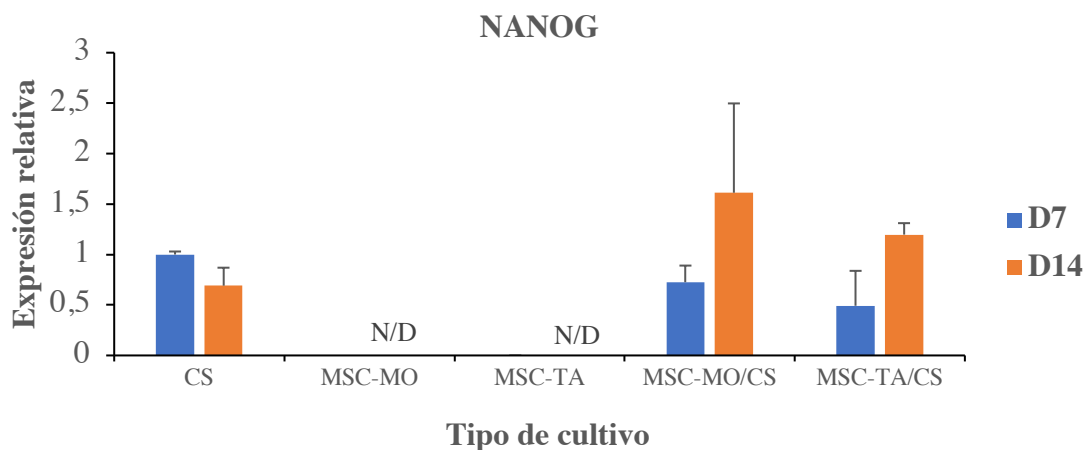
En relación la expresión de mRNA de OCT4 entre monocultivos celulares, se detectó mayor ( $P<0,05$ ) expresión de mRNA en MSC-TA ( $1,00 \pm 0,00$ ) al día 0 y MSC-MO y ( $1,90 \pm 0,47$ ) en el día 7 respectivamente (Tabla 2)

**Tabla 2.** Expresión de mRNA de OCT4 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.

| Muestra   | D0                       | D7                       | D14                      | D21       |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| CS        | 0,11 <sup>a</sup> ±0,00  | 0,72 <sup>a</sup> ±0,15  | 1,29 <sup>a</sup> ±0,26  | 0,90±0,40 |
| MSC-MO    | 0,60 <sup>ab</sup> ±0,24 | 1,90 <sup>b*</sup> ±0,47 | 1,48 <sup>a</sup> ±0,39  | 1,10±0,31 |
| MSC-TA    | 1,00 <sup>b</sup> ±0,00  | 1,00 <sup>ab</sup> ±0,01 | 1,52 <sup>a</sup> ±0,52  | 0,82±0,18 |
| MSC-MO/CS |                          | 1,17 <sup>ab</sup> ±0,29 | 2,26 <sup>a*</sup> ±0,38 | 0,28±0,14 |
| MSC-TA/CS |                          | 0,90 <sup>a</sup> ±0,17  | 4,16 <sup>b*</sup> ±0,95 | 0,76±0,42 |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P<0,05$ ).

La expresión de mRNA de NANOG fue detectada ( $P>0,05$ ) en el monocultivo de CS y en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/CS en los días 7 y 14 de cultivo y no fue detectada expresión en los monocultivos de MSC-TA y MSC-MO (Figura 8).



**Figura 8.** Expresión de mRNA del gen de pluripotencia NANOG en los días 7 y 14 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO. La expresión de mRNA de NANOG fue detectada en monocultivo de CS y en los co-cultivos MSC-MO/CS y MSC-TA/CS en los días 7 y 14 ( $P>0,05$ ), en contraste no se detectó en los monocultivos de MSC-TA y MSC-MO. Abreviaciones: N/D (no detectado)

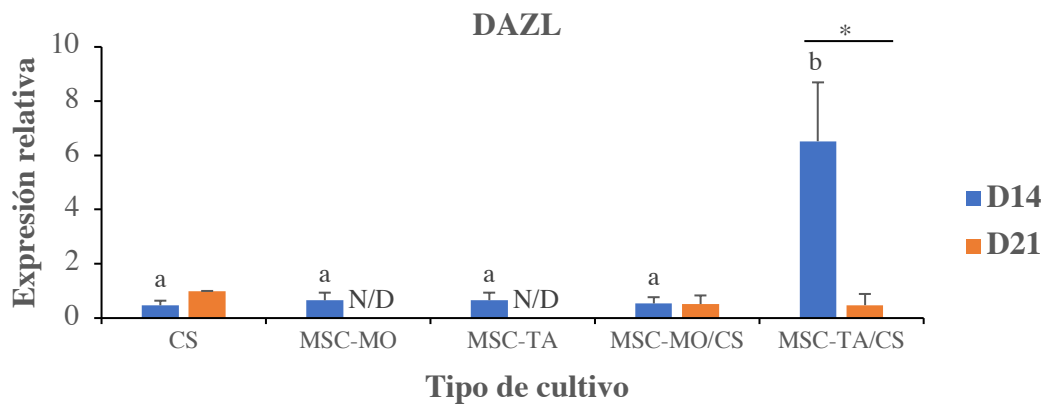
No se detectó expresión de mRNA de NANOG en los monocultivos de MSC-TA y MSC-MO desde el día 0 hasta en el día 21 de cultivo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Expresión de mRNA de NANOG en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.

| Muestra   | D0 | D7        | D14       | D21 |
|-----------|----|-----------|-----------|-----|
| CS        | -  | 1,00±0,03 | 0,69±0,18 | -   |
| MSC-MO    | -  | -         | -         | -   |
| MSC-TA    | -  | -         | -         | -   |
| MSC-MO/CS | -  | 0,73±0,16 | 1,61±0,89 | -   |
| MSC-TA/CS | -  | 0,49±0,35 | 1,20±0,11 | -   |



En tanto la expresión de mRNA del marcador germinal DAZL fue mayor ( $P < 0,05$ ) en co-cultivos de MSC-TA/CS al día 14 ( $6,52 \pm 2,17$ ) comparado con el mismo cultivo del día 21 y comparado con los otros tipos de cultivo. la expresión de mRNA de DAZL no fue detectada en monocultivos de MSC-MO y MSC-TA al día 21 (Figura 9).



**Figura 9.** Expresión de mRNA del gen germinal DAZL en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO. la expresión de mRNA del marcador germinal DAZL fue mayor ( $P < 0,05$ ) en co-cultivos de MSC-TA/CS al día 14 comparado con el día 21 de cultivo y demás tipos de cultivo. La expresión de mRNA de DAZL no fue detectada en monocultivos de MSC-MO y MSC-TA al día 21. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de *cultivo* ( $P < 0,05$ ). Abreviaciones: N/D (no detectado).

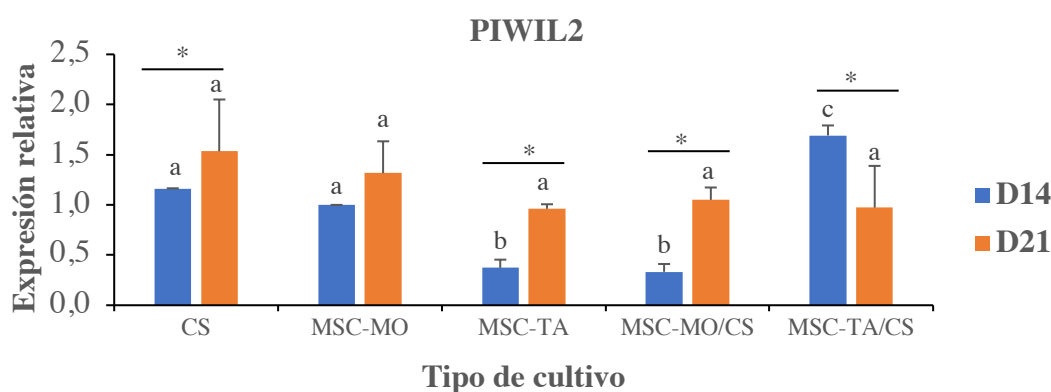
En cuanto al análisis de expresión de DAZL entre días de cultivo para cada tipo de cultivo, se pudo detectar mayor ( $P < 0,05$ ) expresión de mRNA en MSC-MO ( $3,03 \pm 0,19$ ) en comparación con otros tipos de cultivo al día 0 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Expresión de mRNA de DAZL en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.

| Muestra   | D0                       | D7                      | D14                      | D21       |
|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------|
| CS        | 1,37 <sup>a</sup> ±0,13  | 0,87 <sup>a</sup> ±0,19 | 0,47 <sup>a*</sup> ±0,17 | 1,00±0,00 |
| MSC-MO    | 3,03 <sup>b*</sup> ±0,19 | 0,84 <sup>a</sup> ±0,16 | 0,66 <sup>a</sup> ±0,28  | N/D       |
| MSC-TA    | 1,00 <sup>a</sup> ±0,00  | 0,84 <sup>a</sup> ±0,50 | 0,66 <sup>a</sup> ±0,28  | N/D       |
| MSC-MO/CS | -                        | 1,77 <sup>a</sup> ±1,42 | 0,54 <sup>a</sup> ±0,23  | 0,52±0,32 |
| MSC-TA/CS | -                        | 0,64 <sup>a</sup> ±0,42 | 6,52 <sup>b*</sup> ±0,41 | 0,48±0,41 |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo (P<0,05).

La expresión de mRNA de PIWIL 2, fué mayor (P<0,05) en co-cultivo de MSC-TA/CS (1,7 ± 0,1) al día 14 en comparación con los cultivos de MSC-TA y MSC-MO/CS (0,37±0,08; 0,33±0,08). Las MSC-TA y el co-cultivo MSC-MO/CS presentaron menor (P<0,05) expresión de mRNA de PIWIL2 en el día 14 comparando con el co-cultivo de MSC-TA/CS, pero aumentaron la expresión de mRNA de PIWIL 2 al día 21 de cultivo (0,96±0,05; 1,05±0,12).



**Figura 10.** Expresión de mRNA del gen germinal PIWIL2 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO. La expresión de mRNA del marcador germinal PIWIL2 fue mayor (P<0,05) en co-cultivos de MSC-TA/CS al día 14 comparado con el día 21 de cultivo y los cultivos de MSC-TA y MSC-MO/CS. El co-cultivo de MSC-MO/CS aumentó la expresión de mRNA de PIWIL2 al día 21 de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo (P<0,05).

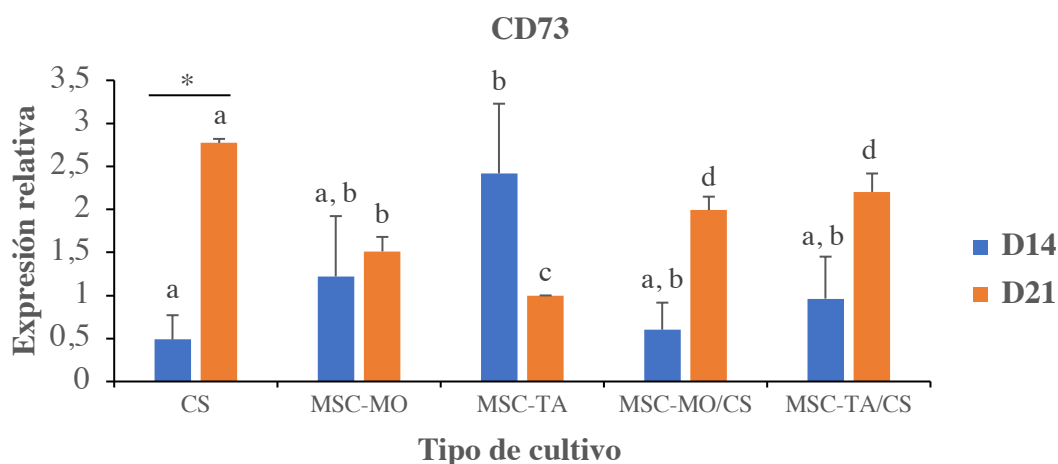
En cuanto al análisis de expresión de PIWIL 2 entre días de cultivo para cada tipo de tratamiento, se pudo detectar mayor expresión de mRNA en CS al día 21 de cultivo ( $1,52 \pm 0,52$ ) en comparación con distintos días de cultivo y tipos de cultivo. Además, se detectó mayor expresión de mRNA en MSC-MO y MSC-TA al día 0 de cultivo ( $1,48 \pm 0,29$ ) en comparación con CS. Así mismo se pudo detectar mayor expresión de mRNA en MSC-TA al día 0 de cultivo ( $1,00 \pm 0,0$ ) en comparación con los otros días de cultivo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Expresión de mRNA de PIWIL2 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.

| Muestra   | D0                   | D7                   | D14                  | D21                 |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| CS        | $0,18^{a*} \pm 0,01$ | $1,39^{a*} \pm 0,07$ | $1,16^{a*} \pm 0,01$ | $1,52^{*} \pm 0,52$ |
| MSC-MO    | $1,48^{b*} \pm 0,29$ | $1,00^{b*} \pm 0,00$ | $1,00^{a*} \pm 0,00$ | $1,32 \pm 0,32$     |
| MSC-TA    | $1,00^{b*} \pm 0,0$  | $0,68^{c*} \pm 0,01$ | $0,37^{b*} \pm 0,08$ | $0,96 \pm 0,05$     |
| MSC-MO/CS | -                    | $1,15^{d*} \pm 0,00$ | $0,33^{b*} \pm 0,08$ | $1,05 \pm 0,12$     |
| MSC-TA/CS | -                    | $0,50^{e*} \pm 0,01$ | $1,69^{c*} \pm 0,10$ | $0,97 \pm 0,42$     |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P < 0,05$ ).

La expresión de mRNA de CD73 fue mayor ( $P < 0,05$ ) en los co-cultivos de MSC-TA/CS y de MSC-MO/CS ( $2,2 \pm 0,21$  y  $1,99 \pm 0,16$ , respectivamente) al día 21 de cultivo en comparación con monocultivos de MSC-TA y de MSC-MO, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron diferencias ( $P > 0,05$ ) de expresión de mRNA de CD73 entre los co-cultivos y sus respectivos monocultivos al día 14 de cultivo (Figura 11).



**Figura 11.** Expresión de mRNA del gen mesenquimal CD73 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO. La expresión de mRNA de CD73 fue mayor ( $P<0,05$ ) en los co-cultivos de MSC-TA/CS y de MSC-MO/CS al día 21 de cultivo en comparación con monocultivos de MSC-TA y de MSC-MO, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P<0,05$ ).

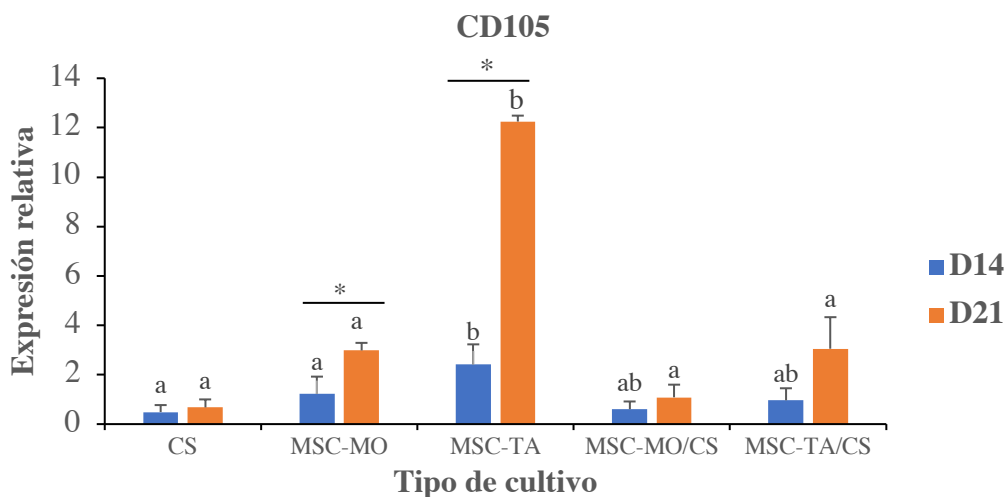
En relación la expresión de mRNA de CD73 entre los tipos y días de cultivo, se detectó mayor expresión ( $P<0,05$ ) en las CS ( $2,77\pm 0,05$ ) en el día 21, mientras que los demás tipos de cultivo no presentaron diferencias ( $P>0,05$ ) de expresión en los distintos días experimentales (Tabla 6).

**Tabla 6.** Expresión de mRNA de CD73 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.

| Muestra   | D0                           | D7                           | D14                           | D21                          |
|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| CS        | 2,38 <sup>a</sup> $\pm$ 0,18 | 5,71 <sup>a</sup> $\pm$ 2,31 | 0,49 <sup>a</sup> $\pm$ 0,28  | 2,77 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05 |
| MSC-MO    | 1,30 <sup>a</sup> $\pm$ 0,30 | 3,01 <sup>b</sup> $\pm$ 1,08 | 1,22 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,70 | 1,51 <sup>b</sup> $\pm$ 0,17 |
| MSC-TA    | 1,96 <sup>a</sup> $\pm$ 0,46 | 0,77 <sup>c</sup> $\pm$ 0,23 | 2,42 <sup>b</sup> $\pm$ 0,81  | 1,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,00 |
| MSC-MO/CS | -                            | 3,30 <sup>b</sup> $\pm$ 1,42 | 0,60 <sup>b</sup> $\pm$ 0,31  | 1,99 <sup>d</sup> $\pm$ 0,16 |
| MSC-TA/CS | -                            | 2,15 <sup>b</sup> $\pm$ 1,20 | 0,96 <sup>b</sup> $\pm$ 0,49  | 2,20 <sup>d</sup> $\pm$ 0,21 |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P<0,05$ ).

En cuanto la expresión de mRNA de CD105, se detectó menor expresión ( $P < 0,05$ ) en co-cultivo de MSC-TA/CS ( $3,05 \pm 1,28$ ) en comparación a monocultivo de MSC-TA ( $12,25 \pm 0,24$ ) al día 21 de cultivo, mientras el co-cultivo de MSC-MO/CS expresó sin diferencias ( $P > 0,05$ ) en comparación con el monocultivo de MSC-MO el día 21 de cultivo (Figura 12).



**Figura 12.** Expresión de mRNA del gen mesenquimal CD105 en los días 14 y 21 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO. Se detectó menor ( $P < 0,05$ ) expresión en co-cultivo de MSC-TA/CS en comparación a monocultivo de MSC-TA al día 21 de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P < 0,05$ ).

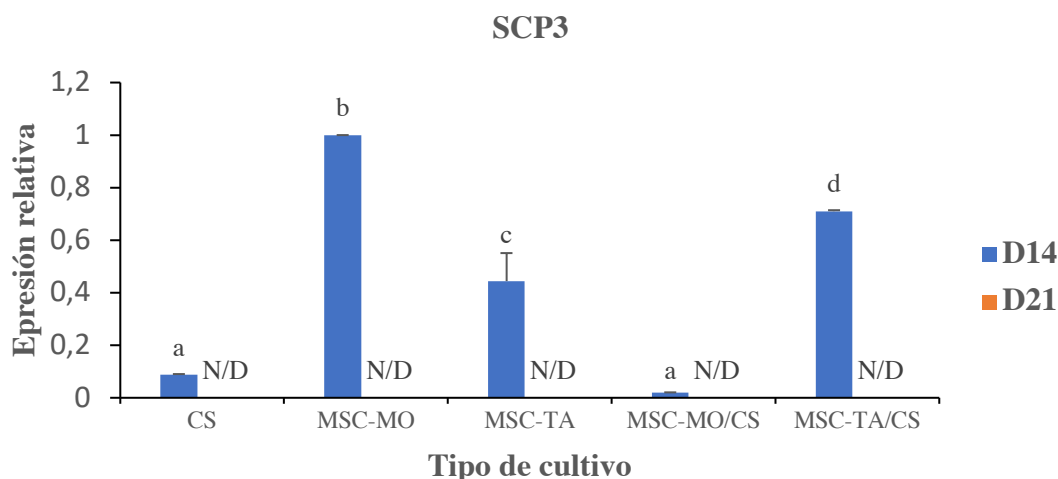
En cuanto al análisis de expresión de CD105 entre días de cultivo para cada tipo de cultivo, se detectó mayor ( $P < 0,05$ ) expresión de mRNA de CD105 en las MSC-TA ( $2,42 \pm 0,81$ ) en comparación a CS ( $0,45 \pm 0,28$ ) al día 14 de cultivo. Así mismo, se detectó mayor expresión ( $P < 0,05$ ) en las MSC-TA ( $12,25 \pm 0,24$ ) al día 21 en comparación con distintos cultivos y días de cultivo. Las MSC-MO al igual que las MSC-TA, aumentaron la expresión ( $P < 0,05$ ) de mRNA al día 21 de cultivo. La expresión ( $P > 0,05$ ) en los demás tipos celulares no cambió ( $P > 0,05$ ) en cuanto a días de cultivo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Expresión de mRNA de CD105 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo.

| Muestra   | D0                       | D7                       | D14                      | D21                       |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| CS        | 0,28 <sup>a</sup> ±0,11  | 1,36 <sup>ab</sup> ±0,68 | 0,49 <sup>a</sup> ±0,28  | 0,68 <sup>a</sup> ±0,32   |
| MSC-MO    | 0,61 <sup>ab</sup> ±0,17 | 0,79 <sup>b</sup> ±0,21  | 1,22 <sup>ab</sup> ±0,70 | 2,28 <sup>a*</sup> ±0,31  |
| MSC-TA    | 1,00 <sup>b</sup> ±0,00  | 3,27 <sup>a</sup> ±1,15  | 2,42 <sup>b</sup> ±0,81  | 12,25 <sup>b*</sup> ±0,24 |
| MSC-MO/CS | -                        | 0,86 <sup>b</sup> ±0,35  | 0,60 <sup>ab</sup> ±0,31 | 1,08 <sup>a</sup> ±0,51   |
| MSC-TA/CS | -                        | 1,12 <sup>ab</sup> ±0,54 | 0,96 <sup>ab</sup> ±0,49 | 3,05 <sup>a</sup> ±1,28   |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo (P<0,05).

La expresión de mRNA de SCP3 fue mayor (P<0,05) en co-cultivos de MSC-TA/CS (0,71±0,004) en comparación a monocultivo de MSC-TA (0,44±0,11) al día 14 de cultivo. La expresión de mRNA de SCP3 fue menor (P<0,05) en co-cultivo de MSC-MO/CS (0,02±0,0003) en comparación a monocultivo de MSC-MO (1,00±0,0002) al día 14 de cultivo y al día 21 de cultivo no fue detectada expresión de mRNA de SCP3. (Figura 13).



**Figura 13.** Expresión de mRNA para el gen SCP3 en los días 14 y 21. Se detectó mayor (p<0,05) expresión de mRNA en el co-cultivo de MSC-TA/CS al día 14 de cultivo. No fue detectada expresión de mRNA de SCP3 al día 21 de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo (P<0,05).

En cuanto al análisis de expresión de SCP3, las MSC-MO expresaron el mismo ( $P > 0,05$ ) nivel de mRNA de SCP3 en 7 y 14 días de cultivo ( $1,00 \pm 0,0002$ ;  $1,00 \pm 0,003$ ). Los cultivos de CS y MSC-TA bajaron ( $P < 0,05$ ) la expresión al día 14 de cultivo, en tanto el mRNA de SCP3 no fue detectado en los días 0 y 21 (Tabla 8).

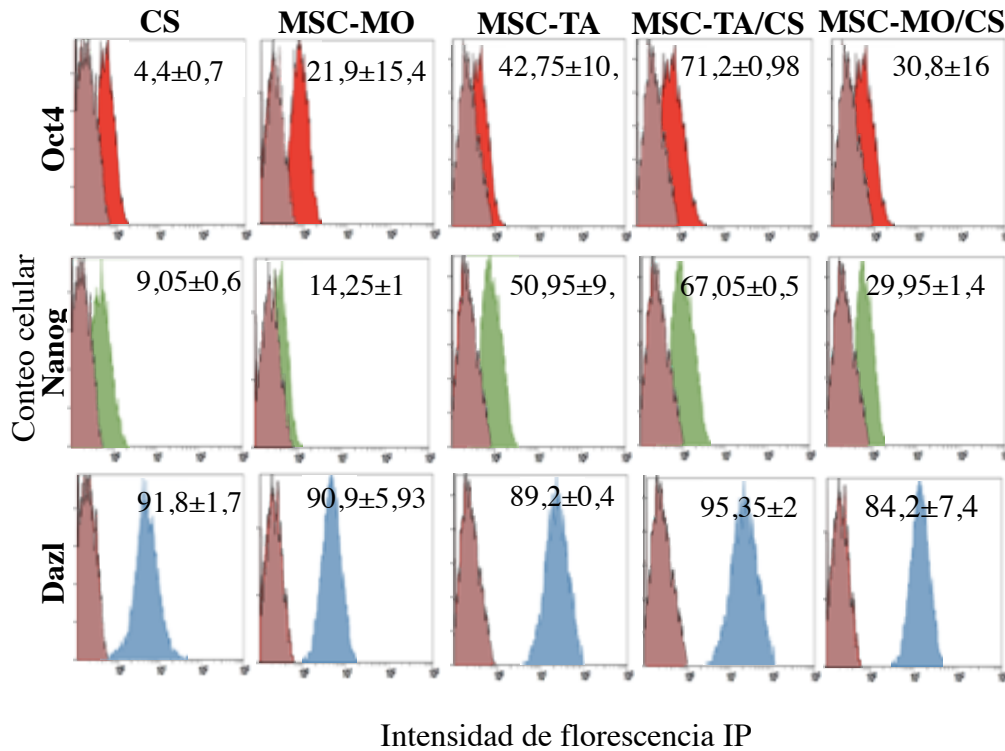
**Tabla 8.** Expresión de mRNA de SCP3 en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO durante un periodo de 21 días de cultivo

| Muestra   | D0 | D7                          | D14                       | D21 |
|-----------|----|-----------------------------|---------------------------|-----|
| CS        | -  | 7,05 <sup>a,*</sup> ±3,02   | 0,09 <sup>a</sup> ±0,01   | -   |
| MSC-MO    | -  | 1,00 <sup>a</sup> ±0,0002   | 1,00 <sup>b</sup> ±0,003  | -   |
| MSC-TA    | -  | 23,30 <sup>b,*</sup> ±0,001 | 0,44 <sup>c</sup> ±0,11   | -   |
| MSC-MO/CS | -  | 2,66 <sup>a,*</sup> ±1,18   | 0,02 <sup>a</sup> ±0,0003 | -   |
| MSC-TA/CS | -  | 3,43 <sup>a,*</sup> ±0,83   | 0,71 <sup>d</sup> ±0,004  | -   |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo por día. Asterisco (\*) indica diferencias entre días dentro de cada tipo de cultivo ( $P < 0,05$ ).

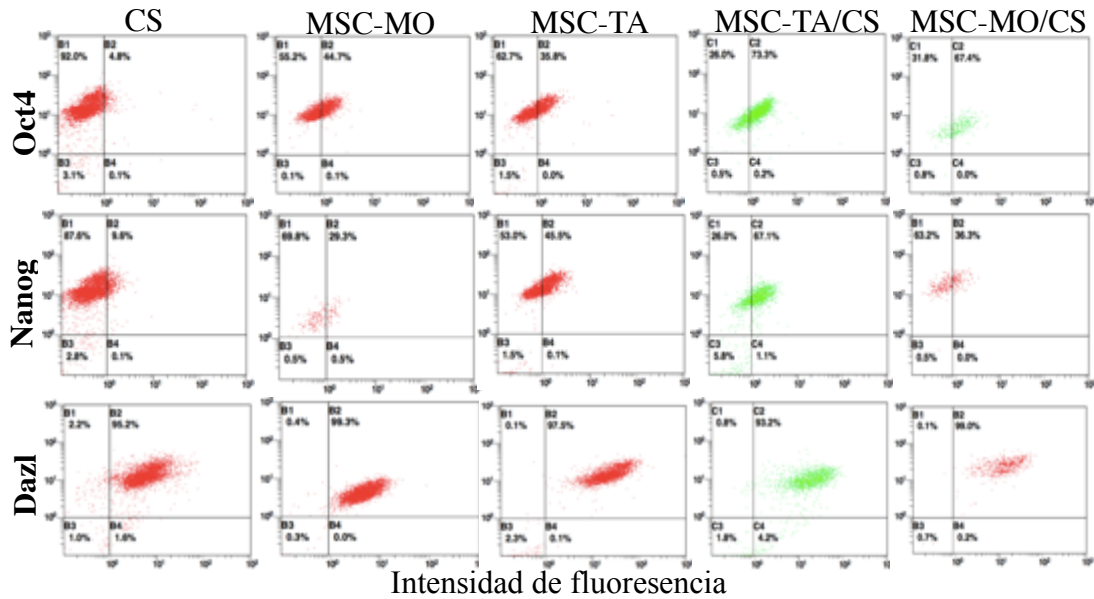
### **Evaluación del efecto del co-cultivo de MSC fetales bovinas con CS sobre la expresión de marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4 y germinal Dazl**

La población celular positiva a la expresión de las proteínas Oct4, Nanog y Dazl, fue cuantificada en monocultivos y co-cultivos de CS, MSC-MO y MSC-TA mediante citometría de flujo. Se detectó una mayor ( $P < 0,05$ ) proporción de células positivas a Oct4 ( $71,2 \% \pm 0,98$ ) en el co-cultivo de MSC-TA/CS en comparación con el monocultivo de CS ( $4,4 \% \pm 0,70$ ) y con los cultivos de MSC-MO ( $21,95 \% \pm 15,45$ ) y los co-cultivos de MSC-MO/CS ( $30,8 \% \pm 16,97$ ). Para Nanog se cuantificó una mayor ( $P < 0,05$ ) proporción de células positivas ( $67,1 \% \pm 0,46$ ) en el co-cultivo de MSC-TA/CS en comparación con el monocultivo de CS ( $9,05 \% \pm 0,60$ ) y con los cultivos de MSC-MO ( $14,25 \% \pm 10$ ) y de MSC-TA ( $50,9 \% \pm 9,29$ ) y co-cultivos de MSC-MO/CS ( $29,95 \% \pm 1,38$ ). Para Dazl, la proporción de células positivas a este marcador no fueron distintas ( $P > 0,05$ ) entre los monocultivos de CS ( $91,75 \% \pm 1,66$ ), MSC-MO ( $90,9 \% \pm 5,93$ ), MSC-TA ( $89,2 \% \pm 0,42$ ) y los co-cultivos de MSC-MO/CS ( $84,2 \% \pm 7,35$ ) y MSC-TA/CS ( $95,35 \% \pm 2,02$ ) (Figura 14 y 15; Tabla 9).



**Figura 14.** Histogramas representativos de la población celular positiva a Nanog, Oct4 y Dazl en monocultivos y co-cultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS luego de 21 días de cultivo. Se cuantificaron mayores ( $P < 0,05$ ) proporciones de células positivas a Oct4 en el co-cultivo de MSC-TA/CS (área roja). Además, se detectó una mayor ( $P < 0,05$ ) proporción de células positivas a Nanog en el co-cultivo de MSC-TA/CS (área verde). La proporción de células positivas a Dazl no fue distinta entre los tipos de cultivo (área celeste). Área café, control de autofluorescencia.





**Figura 15.** Análisis de dot plot de citometría de flujo representativos de los marcadores Nanog, Oct4 y Dazl en monocultivos y co-cultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS. Las poblaciones celulares de los monocultivos y co-cultivos presentaron una proporción positiva (fluorescencia mayor a la primera década) a los marcadores de pluripotencia Nanog y Oct4 y germinal Dazl.

**Tabla 9.** Población celular en monocultivos y co-cultivos de MSC-TA, MSC-MO y CS positivas a marcadores de pluripotencia Nanog, Oct4 y Dazl.

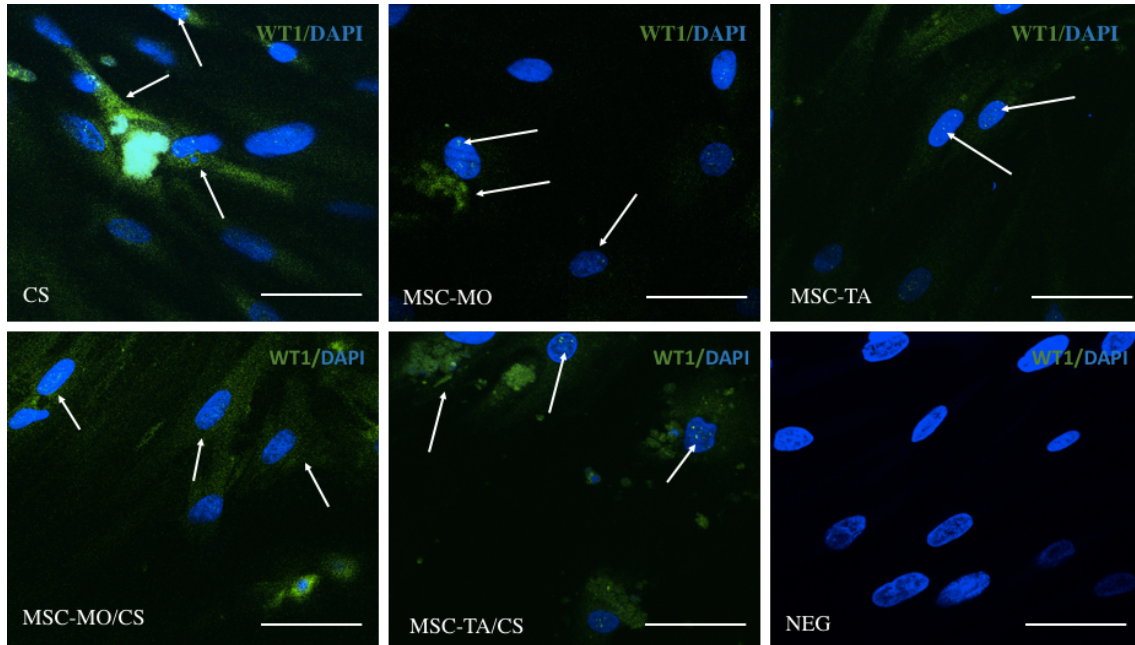
|       | CS                       | MSC-MO                      | MSC-TA                      | MSC-TA/CS                | MSC-MO/CS                  |
|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Oct4  | 4,4 <sup>a</sup> ±0,70   | 21,95 <sup>a,b</sup> ±15,45 | 42,75 <sup>a,b</sup> ±10,35 | 71,2 <sup>b</sup> ±0,98  | 30,8 <sup>a,b</sup> ±16,97 |
| Nanog | 9,05 <sup>a</sup> ±0,60  | 14,25 <sup>a</sup> ±10,00   | 50,95 <sup>b,c</sup> ±9,29  | 67,05 <sup>c</sup> ±0,46 | 29,95 <sup>ab</sup> ±1,38  |
| Dazl  | 91,75 <sup>a</sup> ±1,66 | 90,9 <sup>a</sup> ±5,93     | 89,2 <sup>a</sup> ±0,42     | 95,35 <sup>a</sup> ±2,02 | 84,2 <sup>a</sup> ±7,35    |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de cultivo.

### **Evaluación del efecto del co-cultivo de MSC fetales bovinas con CS sobre la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia.**

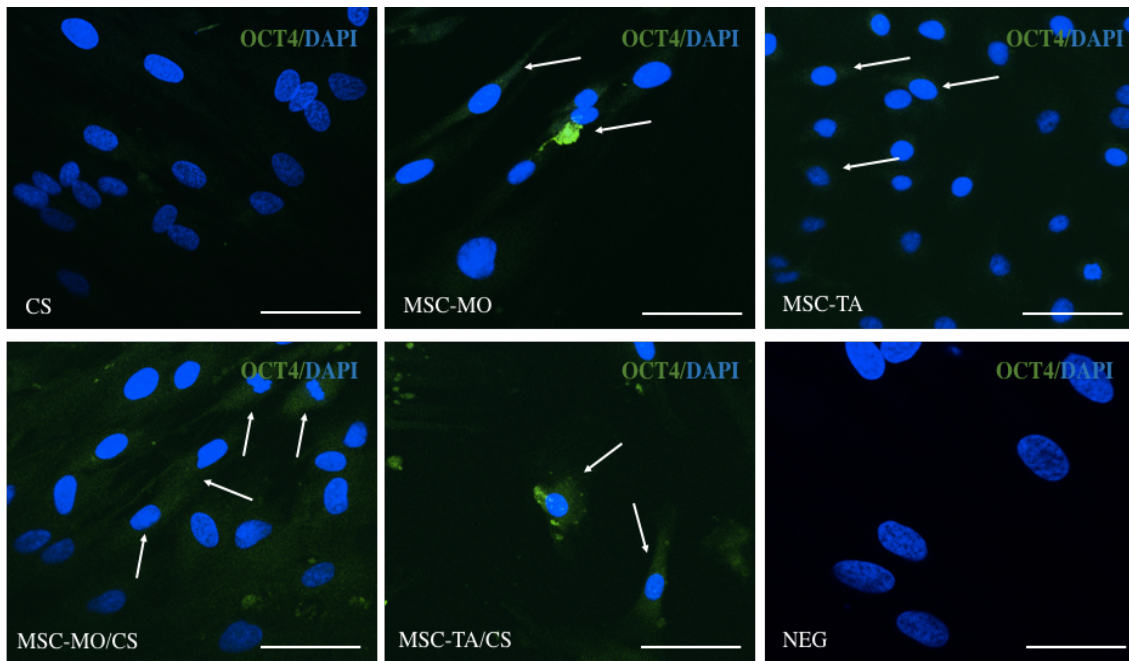
Las proteínas Wt1, Oct4, Nanog y Dazl, fueron inmunodetectadas en monocultivos de CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos de MSC-TA/CS y MSC-MO/CS.

Para Wt1 se observó un patrón de fluorescencia nuclear, citoplasmático y profuso en CS y en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/CS y un patrón nuclear difuso asociada a Wt1 en los monocultivos de MSC-MO y MSC- TA (Figura 16).



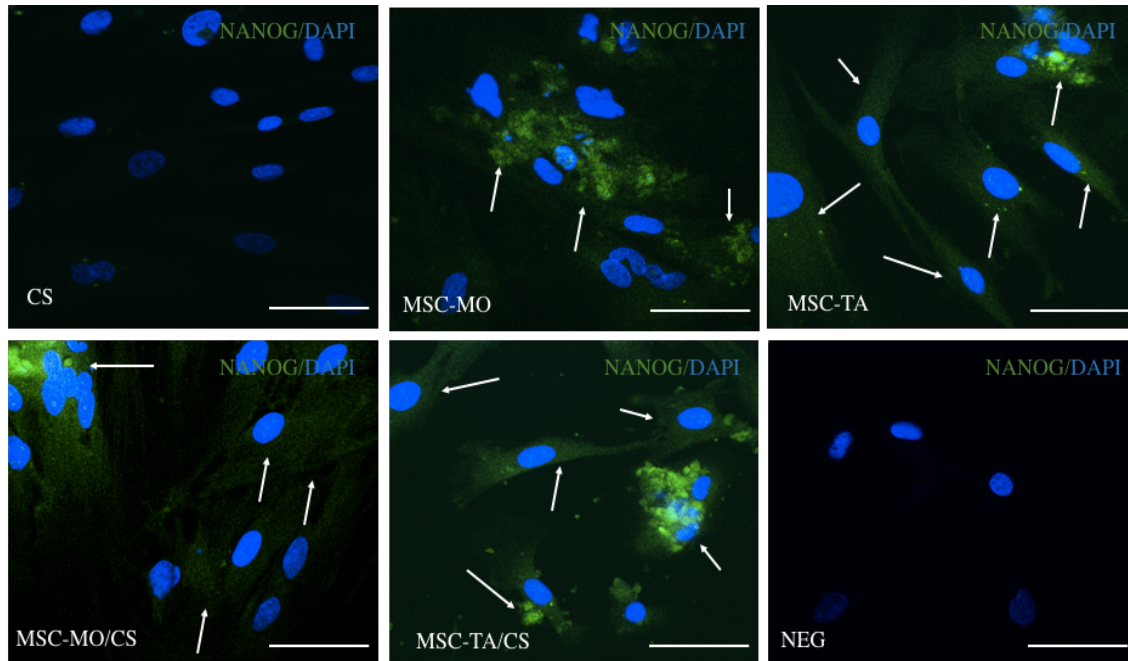
**Figura 16.** Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Wt1 en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo. Se observó un patrón de fluorescencia asociado a Wt1 (Flechas blancas) nuclear, citoplasmático y profuso en CS (A) y en los co-cultivos de MSC-MO/CS (E) y de MSC-TA/CS (D) y un patrón nuclear difuso asociada a Wt1 en los monocultivos de MSC-MO (C) y MSC- TA (B). F, control negativo. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Para el marcador Oct4, se observó un patrón de fluorescencia citoplasmático de mayor intensidad en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/CS y una fluorescencia citoplasmática de menor intensidad en los monocultivos de MSC-MO y MSC-TA. No se detectó fluorescencia asociada a Oct4 en los monocultivos de CS (Figura 17).



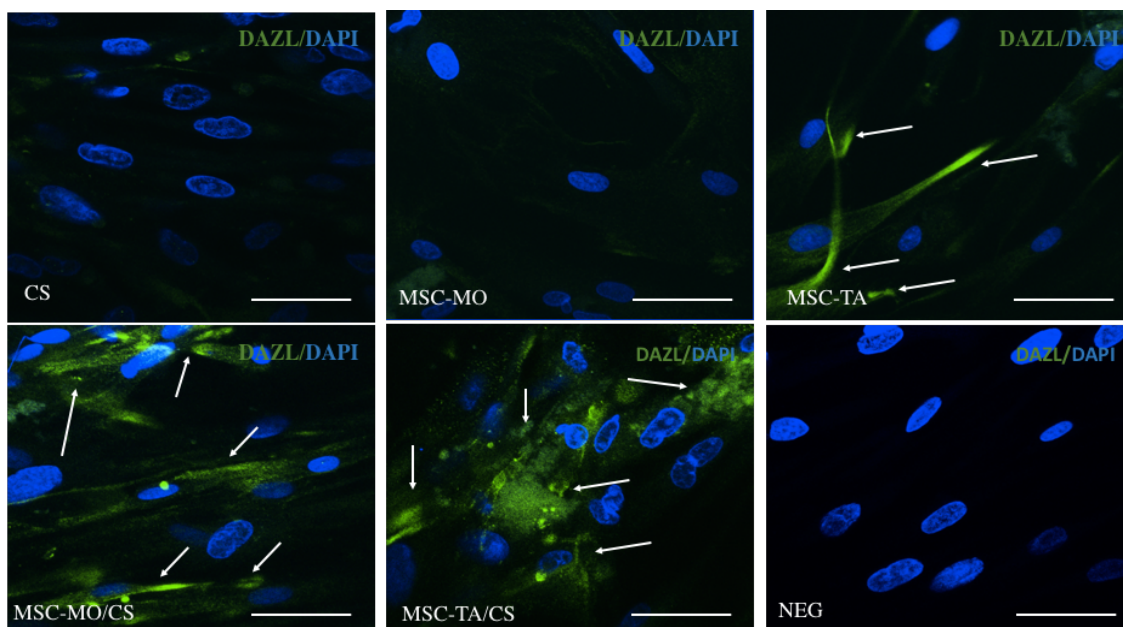
**Figura 17.** Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Oct4 en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo. Se observó un patrón de fluorescencia asociado a Oct4 (Flechas blancas) citoplasmático de mayor intensidad en los co-cultivos de MSC-MO/CS (D) y de MSC-TA/CS (E) y una fluorescencia citoplasmática de menor intensidad en los monocultivos de MSC-MO (B) y MSC-TA (C). No se detectó fluorescencia asociada a Oct4 en los monocultivos de CS (A). F, control negativo. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Para Nanog se observó un patrón de fluorescencia citoplasmático localizado en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/SC y en monocultivo de MSC-TA. En comparación se detectó un patrón difuso y perinuclear en el monocultivo de MSC-MO (Figura 18).



**Figura 18.** Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Nanog en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo. Se observó un patrón de fluorescencia citoplasmático asociado a Nanog (Flechas blancas) localizado en los co-cultivos de MSC-MO/CS (D) y de MSC-TA/CS (E) y en monocultivo de MSC-TA (C) (Figura 18). En comparación se detectó un patrón difuso y perinuclear en el monocultivo de MSC-MO (B). F, control negativo. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Se observó un patrón citoplasmático y perinuclear de fluorescencia con mayor intensidad asociada a Dazl en los co-cultivos de MSC-MO/CS y MSC-TA/CS en comparación con los monocultivos de CS, MSC-MO y MSC-TA (Figura 19).



**Figura 19.** Microfotografía confocal de inmunofluorescencia asociada a Dazl en CS, MSC-TA, MSC-MO y co-cultivos al día 14 de cultivo. La fluorescencia asociada a Dazl (Flechas blancas) fue detectada con mayor intensidad en los co-cultivos de MSC-MO/CS (D) y MSC-TA/CS (E) en comparación con los monocultivos de CS (A), MSC-MO (B) y MSC-TA (C). F, control negativo. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

## Discusión

En el presente estudio se evaluó el efecto de un sistema de co-cultivo *in vitro* de CS sobre el potencial de diferenciación germinal de MSC-MO y MSC-TA derivadas de fetos bovinos. Las MSC-MO adherentes al plástico han sido previamente caracterizadas mediante análisis de Q-PCR y de citometría de flujo, los cuales permitieron identificar que éstas se encuentran formadas por poblaciones celulares positivas a marcadores mesenquimáticos CD29 y CD73 y negativas a marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (Cortes et al., 2013; Dueñas et al., 2014). En estos estudios se determinó además que las MSC fetales bovinas adherentes al plástico poseen capacidad de diferenciación hacia linajes celulares mesodérmicos, ectodérmicos y endodérmicos (Cortes et al., 2013;

Dueñas et al., 2014). Estas propiedades indican que las MSC bovinas cumplen con los requisitos establecidos por la ISCT para el establecimiento de una línea de MSC (Dominici et al., 2006).

Las CS de toro fueron aisladas desde parénquima testicular mediante digestión enzimática y mecánica. La población de CS fue caracterizada mediante determinación de los marcadores específicos WT1 y RA. Estas proteínas han sido previamente caracterizadas como marcadores específicos de CS en modelos murino y humano (Sharpe et al., 2003; Wang, 2006; Guo, 2015). La función de WT1 está relacionada con el desarrollo de la gónada y vinculada al control, como factor de transcripción, del desarrollo del sistema urogenital embrionario (Parker et al., 1999). WT1 regula la señal inductiva del mesénquima hacia el epitelio celómico del mesonefros, controlando el crecimiento de las crestas gonadales que darán origen a las CS (Swain y Lovell-Badge, 1999). En tanto, RA se expresa en las CS y media la acción de los andrógenos, principalmente testosterona y 5-alfadihidrotestosterona (Collins, et al., 2003). El RA funciona como un receptor nuclear y como factor de transcripción dependiente del ligando, regulando la expresión de una gran variedad de genes involucrados en el desarrollo de la pubertad y de la fertilidad del macho (Collins, et al., 2003). En nuestro estudio, la población de CS aislada desde parénquima testicular de toro fue mayoritariamente positiva a WT1 y expresó altos niveles de mRNA de WT1 y RA, indicando una alta pureza y homogeneidad en los cultivos.

Las CS proporcionan un microambiente esencial para la proliferación y diferenciación de las células germinales (Xie et al., 2015). Estas células secretan una amplia gama de factores de crecimiento y citoquinas esenciales para espermatogénesis como IGF1, FGF básico, TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, SCF, GDNF, Lactato, y otros elementos solubles (Ruwanpura et al., 2010). En el presente estudio se desarrollaron co-cultivos *in vitro* de MSC-MO/CS y MSC-TA/CS con el objetivo de establecer un micro ambiente que permitiera la diferenciación de MSC hacia células germinales de macho. Posteriormente, los co-cultivos fueron comparados con los monocultivos en cuanto a morfología y expresión de marcadores mesenquimáticos, de pluripotencia, germinales tempranos y germinales de macho, mediante Q-PCR, citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Los co-cultivos de MSC-TA/CS sufrieron cambios morfológicos caracterizados por la pérdida de la forma fibroblastoide y el desarrollo de colonias circundadas por células

con morfología similar a CS. En el caso de los co-cultivos de MSC-MO/CS se observó la formación de agregados celulares con morfología fibroblastoide. Estos cambios fueron distintos a los observados en los monocultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO, los cuales mantuvieron su morfología fibroblastoide característica. Cambios similares en la morfología del co-cultivo de MSC-TA/CS han sido reportados en estudios anteriores utilizando células humanas (Xie et al., 2015). Los cambios morfológicos observados en los co-cultivos, pueden ser consecuencia de conexiones intercelulares caracterizadas por la presencia de proteínas de enlace celular como las conexinas. A pesar de que su expresión no fue evaluada, las conexinas son proteínas que forman canales de unión intercelular y transferencia de moléculas de señalización intracelular como citocinas, hormonas y otros factores que son producidos por las células en el microambiente y que pueden activar el proceso de diferenciación celular (Sluka et al., 2006).

En el presente estudio se determinó que las células de MSC-TA/CS co-cultivadas por 14 días aumentaron la expresión de mRNA del gen germinal DAZL en relación a los monocultivos de CS y MSC-TA. La proporción de células positivas a Dazl, sin embargo, no fue distinta entre el co-cultivo de MSC-TA/CS y los monocultivos. Estos datos sugieren que el microambiente de CS puede ejercer un efecto inductor de la transcripción DAZL, sin embargo, este efecto no se traduce en una mayor proporción de MSC-TA que expresan la proteína. El gen germinal DAZL se expresa específicamente en PGC, SSC y células germinales masculinas (Clark et al., 2004). Uno de los productos proteicos del gen DAZL se expresa durante la mayor parte de la vida de las células germinales y es necesario para el desarrollo de PGC y para la diferenciación y maduración de CG a partir de PGC hacia adelante (Clark et al., 2004). La expresión de DAZL en los monocultivos de CS, MSC-TA y MSC-MO, así como su aumento en los niveles de mRNA en co-cultivos de MSC-TA/CS sugieren que este tipo celular tiene un mayor potencial de diferenciación germinal comparado con las MSC-MO. Adicionalmente, dado su rol como regulador maestro en el proceso de espermatogénesis, la expresión de DAZL puede ser fundamental en la potencial inducción *in vitro* de la diferenciación germinal de MSC.

En forma similar, la expresión de mRNA del marcador de célula germinal de macho PIWIL aumentó en células del co-cultivo de MSC-TA/CS, comparado con el monocultivo de MSC-TA. El gen PIWIL2, se expresa exclusivamente en GC (espermatogonias y SSCs) (Lee et al., 2006). Este gen tiene un papel en la auto-renovación de los SSC y la espermatogénesis y es necesario para la reparación del daño

del ADN inducido por diversos tipos de agentes genotóxicos (Lee et al., 2006). En el ratón, se ha demostrado que los mutantes nulos de PIWIL2 tienen espermatogénesis incompleta y no pueden producir espermatozoides (Kuramochi-Miyagawa et al., 2004). La expresión de PIWIL2 ha sido reportada en MSC-MO ovinas tratadas con BMP4, BMP8b y TGFb1 (Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2014), lo que sugiere que la activación de PIWIL puede ser modulada por el ambiente extracelular. En forma similar, en nuestro estudio, el aumento en la expresión de PIWIL puede ser consecuencia de un posible efecto inductor germinal de CS sobre MSC-TA, sin embargo, es posible que también sea consecuencia de la alta expresión de PIWIL en el CS.

La expresión de mRNA de OCT4 fué mayor en los co-cultivos de MSC-MO/CS y de MSC-TA/CS en relación los monocultivos de CS, MSC-MO y MSC-TA. OCT4 es fundamental en la pérdida del estado de indiferenciación en células madres embrionarias (CME) y en el caso de las MSC, puede también cumplir un rol en la potencial diferenciación germinal de MSC asociada a co-cultivo con CS. En forma similar, la expresión de NANOG fue detectada en los monocultivos de CS y en los co-cultivos de MSC-TA/CS y MSC-MO/CS. En el caso de la activación de NANOG en los co-cultivos de MSC-TA/CS y MSC-MO/CS, su expresión puede ser consecuencia del efector inductor germinal de las CS sobre las MSC, Sin embargo, esta activación también puede ser consecuencia de los altos niveles de expresión de NANOG encontrados en el monocultivo de CS. OCT4 y NANOG son factores de transcripción involucrados en la regulación de la pluripotencia durante el desarrollo embrionario y se detectan tanto en células pluripotentes, como en otras células germinales precoces (Nagano, 2007). NANOG es un factor regulador de transcripción tipo homeodominio que se une a la secuencia TAAT y representa el principal objetivo del complejo OCT4/SOX2. NANOG es reactivado en las GC en sus inicios (Yamaguchi et al., 2005). La regulación de NANOG es un complejo proceso que incluye la regulación de sus promotores mediante OCT4 y SOX2, así también por P53 y factores de crecimiento como LIF y BMP (Pan y Thomson, 2007). En conjunto, estos tres factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG regulan una red de genes involucrados en la pluripotencialidad compuesta por aproximadamente 1400 genes diana, siendo estos subdivididos en 4 grupos principales: factores de transcripción, factores remodeladores de cromatina, reguladores de los ciclos celulares y supresores de señal. Estudios anteriores han encontrado expresión de OCT4 en MSC-MO ovino tratadas con TGFb1, BMP4 y BMP8b (Ghasemzadeh-Hasankolaei et



al., 2014) y de OCT4 y NANOG en MSC-MO humanas tratadas con AR (Hua et al. 2009). Estos resultados sugieren que ambos factores de transcripción OCT4 y NANOG están presentes en MSC durante el proceso de diferenciación germinal. Sin embargo, el rol de NANOG en este proceso puede ser de mayor importancia que el de OCT4.

Los niveles de mRNA del marcador CD105 disminuyeron el día 21 de cultivo en el co-cultivo de MSC-TA/CS, en comparación con el monocultivo de MSC-TA. CD105 (Endogлина) es un receptor para los factores de crecimiento TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 y modula su señalización regulando la composición de distintos componentes de la matriz extracelular, como fibronectina y colágeno (Fonsatti et al., 2014). CD73 y CD105 son marcadores característicos de MSC (Dominichi et al., 2006). Sin embargo, nuestros resultados indican que CD73 y CD105 también se expresan en las CS de toro, y por lo tanto no sería selectivo para una población MSC (Chui et al., 2011). Sin embargo, la disminución de los niveles de mRNA de CD105 en el co-cultivo de MSC-TA/CS en el día 21 sugieren que las MSC podrían estar perdiendo el perfil mesenquimal como efecto del co-cultivo con CS y por lo tanto avanzando en el proceso de diferenciación germinal. En contraste, el efecto del co-cultivo no afectó la expresión de CD105 en MSC-MO/CS, lo que indicaría que existen diferencias en cuanto al potencial germinal entre fuentes de tisulares de MSC. En forma similar a CD105, los niveles de mRNA de CD73 aumentaron en los co-cultivos en comparación con los monocultivos de MSC-TA y MSC-MO. Este resultado puede ser consecuencia del microambiente generado por CS sobre el perfil de expresión génica de las MSC. Sin embargo, alternativamente puede ser consecuencia de la alta expresión de CD73 en los monocultivos de CS. CD73 es considerado un marcador de MSC y se cree que está relacionado con mecanismos de adhesión celular, al co-expresarse con moléculas tipo  $\beta$ 2-integrinas, por lo que se ha caracterizado como un mediador de adhesión celular (Barry et al., 2001).

La expresión de mRNA de SCP3 fué menor en el co-cultivo de MSC-TA/CS y no fué distinto entre el co-cultivo de MSC-MO/CS y su monocultivo respectivamente. Además, en el día 14 el co-cultivo de MSC-TA/CS y de MSC-MO/CS bajaron la expresión de mRNA de SCP3 hasta no ser detectable al día 21 de cultivo, mostrando una expresión transitoria. SCP3 es un marcador específico de células germinales meióticas (Marques-Mari et al., 2009). Durante la meiosis, los cromosomas homólogos se aparean y recombinan, un proceso esencial para generar células haploides genéticamente distintas (Yua et al., 2000). El comportamiento único de los cromosomas meióticos se ha

relacionado con las actividades de una estructura supramolecular proteínica específica de la meiosis, el complejo sinaptonémico (SC) (Yua et al., 2000). Los precursores del SC comienzan a aparecer en la etapa leptotena de la fase meiótica I cuando los elementos axiales se hacen visibles por primera vez y la sinapsis se completa en la etapa de paquiteno de la meiosis I, después de lo cual los cromosomas homólogos se separan y el SC se desensambla durante el diploteno y la diaquinesis (Roeder, 1997). La disminución en la expresión de SCP3 en los co-cultivos y la falta de expresión en el día 21 pueden sugerir que las MSC en proceso de diferenciación no alcanzan a iniciar el proceso de meiosis.

En el presente estudio, mediante análisis de Q-PCR, FC e IF hemos caracterizado el proceso de diferenciación germinal en MSC-MO y MSC-TA como consecuencia del efecto del co-cultivo con CS. El patrón de expresión génica representado por la expresión de Nanog, Oct4 y Dazl así como la activación del mRNA de NANOG, la disminución de los niveles de mRNA CD105 y el aumento de los niveles de DAZL y PIWIL en MSC-TA/CS sugieren que el co-cultivo con CS permitió que las MSC-TA alcanzaran un fenotipo germinal premeiótico temprano.

## **Conclusiones**

La expresión de Nanog, Oct4 y Dazl en MSC-MO y MSC-TA, así como la activación del mRNA de NANOG, la disminución de los niveles de mRNA CD105 y el aumento de los niveles de DAZL y PIWIL en MSC-TA sugieren que las MSC fetales bovinas poseen potencial de diferenciación germinal. Los patrones de expresión génica en los co-cultivos de MSC-TA/CS sugieren que las MSC-TA fetales bovinas tienen mayor capacidad de diferenciación hacia linaje germinal en relación a las MSC-MO. Los niveles de mRNA de SCP en las MSC-MO y MSC-TA fueron disminuyendo a lo largo del proceso de diferenciación germinal, lo que indica que éstas no iniciaron la meiosis y solo alcanzaron un estado de diferenciación germinal premeiótico temprano.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alves, M. G., Rato, L., Carvalho, R. A., Moreira, P. I., Socorro, S., y Oliveira, P. F. (2013). Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 70(5), 777-793.
2. Aslam, I., Robins, A., Dowell, K., y Fishel, S. (1998). Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod*, 13(3), 639-645.
3. Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., y Zaia, J. (2001). The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys Res Commun*, 289(2), 519-524.
4. Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., y Fujinaga, T. (2005). Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 319(2), 243-253.
5. Brooke, G., Cook, M., Blair, C., Han, R., Heazlewood, C., Jones, B. (2007). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*, 18(6), 846-858.
6. Bydlowski, S. P., Debes, A. A., Maselli, L. M., y Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 31(supl 1), 25-35.
7. Campos, A., y Germán, L. (2010). Colonización intraluminal testicular de células madres germinales a partir de células madre pluripotentes obtenidas de la masa celular interna en ratones, 35-41. Disponible en: [<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3174>] <Accedido al 12.02.2017>
8. Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M. y Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450(7173), 1230-1234.
9. Chang, Y. J., Tseng, C. P., Hsu, L. F., Hsieh, T. B., y Hwang, S. M. (2006). Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol Int*, 30(6), 495-499.
10. Chuaire, L. y Sánchez, M. C. (2002). Células germinativas primordiales femeninas: Origen y migración hacia los primordios gonadales. *Colomb Med*, 33(4), 171-178.
11. Chui, K., Trivedi, A., Cheng, C. Y., Cherbavaz, D. B., Dazin, P. F., Huynh, A. L. T. y John, C. M. (2011). Characterization and functionality of proliferative human

- Sertoli cells. *J Stem Cell Transplant*, 20(5), 619-635.
12. Clark, A. T., Bodnar, M. S., Fox, M., Rodriguez, R. T., Abeyta, M. J., Firpo, M. T., y Pera, R. A. R. (2004). Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet*, 13(7), 727-739.
  13. Collins, L. L., Lee, H. J., Chen, Y. T., Chang, M., Hsu, H. Y., Yeh, S., y Chang, C. (2003). The androgen receptor in spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res*, 103(3-4), 299.
  14. Cortés, A. Y. (2013). Efecto de la suplementación de suero fetal bovino y ácido ascórbico sobre la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (CMM) bovinas. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131544>.
  15. Costa, J. J. D. N. (2016) Expressão de marcadores de células germinativas e de oócitos em fibroblastos bovinos tratados com 5-aza-citidina e em células-tronco adultas cultivadas in vitro na presença de BMP-2, BMP-4 ou fluido folicular. Doctoral dissertation. UFC. Sobral-CE, 207.
  16. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... y 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.
  17. Dudley, B., Palumbo, C., Nalepka, J., y Molyneaux, K. (2010). BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. *Dev Biol*, 343(1), 84-93.
  18. Dueñas, F., Becerra, V., Cortes, Y., Vidal, S., Sáenz, L., Palomino, J., y Peralta, O. A. (2014). Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res*, 10(1), 154.
  19. Dufour, J. M., Rajotte, R. V., Seeberger, K., Kin, T. y Korbitt, G. S. (2003). Long-term survival of neonatal porcine Sertoli cells in non-immunosuppressed rats. *Xenotransplantation*, 10(6), 577-586.
  20. Fan, P., He, L., Pu, D., Lv, X., Zhou, W., Sun, Y., y Hu, N. (2011). Testicular Sertoli cells influence the proliferation and immunogenicity of co-cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys Res Commun*, 404(3), 829-833.
  21. Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., y Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin*, 58(5), 498-511.

22. Fonsatti, E., y Maio, M. (2004). Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med Epidemiol*, 2(1), 18.
23. Galdos-Riveros, A. C., Rezende, L. C., Turatti, A. G. y Miglino, P. M. A. (2010). A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. *Encicl Biosf*, 6, 1-13.
24. García, M. J. L., Felices, A. U., y Povedano, M. C. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. *OmniaScience*, 1-129.
25. Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K. y Daley, G. Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 427(6970), 148-154.
26. Ghasemzadeh-Hasankolaei, M., Sedighi-Gilani, M. A., y Eslaminejad, M. B. (2014). Induction of Ram Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Germ Cell Lineage using Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Growth Factors. *Reprod Domest Anim*, 49(4), 588-598.
27. Guo, Y., Hai, Y., Yao, C., Chen, Z., Hou, J., Li, Z., y He, Z. (2015). Long-term culture and significant expansion of human Sertoli cells whilst maintaining stable global phenotype and AKT and SMAD1/5 activation. *J Cell Commun Signal*, 13(1), 20.
28. Harvanová, D., Tóthová, T., Sarisský, M., Amrichová, J., y Rosocha, J. (2011). Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol*, 57(3), 119.
29. Hernández Ramírez, P. (2011). Medicina regenerativa y aplicaciones de las células madre: una nueva revolución en medicina. *Rev Cubana Med*, 50(4), 338-340
30. Hess, R. A. y de Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Springer New York, 1-15
31. Hua, J., Pan, S., Yang, C., Dong, W., Dou, Z., y Sidhu, K. S. (2009). Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reprod Biomed*, 19(1), 99-105.
32. Huleihel, M., y Lunenfeld, E. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*, 6(3), 259-268.
33. Kostereva, N., y Hofmann, M. C. (2008). Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod Domest Anim*, 43(s2), 386-392.

34. Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., y Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS USA*, 103(8), 2474-2479.
35. Krampera, M., Pasini, A., Pizzolo, G., Cosmi, L., Romagnani, S., y Annunziato, F. (2006). Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*, 6(4), 435-441.
36. Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T. W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., y Lin, H. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 131(4), 839-849.
37. Lange, U. C., Saitou, M., Western, P. S., Barton, S. C., y Surani, M. A. (2003). The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol*, 3(1), 1-11
38. Lee, J. H., Engel, W., y Nayernia, K. (2006). Stem cell protein Piwil2 modulates expression of murine spermatogonial stem cell expressed genes. *Mol Reprod Dev*, 73(2), 173-179.
39. Linher, K., Dyce, P. y Li, J. (2009). Primordial germ cell-like cells differentiated in vitro from skin-derived stem cells. *PLoS One*, 4(12), e8263.
40. Macías-Abraham, C., del Valle-Pérez, L. O., Hernández-Ramírez, P., y Ballester-Santovenia, J. M. (2010). Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 26(4), 256-275.
41. Marina, S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Rev Iberoam Fertil Reprod Hum*, 20(4), 213-225.
42. Marques-Mari, A. I., Lacham-Kaplan, O., Medrano, J. V., Pellicer, A., y Simón, C. (2009). Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Hum Reprod Update*, 15(3), 379-390.
43. McLaren, A., y Lawson, K. A. (2005). How is the mouse germ-cell lineage established?. *Differentiation*, 73(9-10), 435-437.
44. Monteiro, C. D. B., Bicudo, S. D., Toma, H. S. (2010) O papel das células de Sertoli na espermatogênese. *Pubvet*, 855(4), 1-17.
45. Mouka, A., Tachdjian, G., Dupont, J., Drévilion, L. y Tosca, L. (2016). In Vitro Gamete Differentiation from Pluripotent Stem Cells as a Promising Therapy for Infertility. *Stem Cell Dev*, 25(7), 509-521.
46. Nagano, M. C. (2007). In vitro gamete derivation from pluripotent stem cells:

- progress and perspective. *Biol Reprod*, 76(4), 546-551.
47. Nakamura, A., y Seydoux, G. (2008). Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development*, 135(23), 3817-3827.
  48. Nardi, N. B. y da Silva Meirelles, L. (2008). Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. In: *Stem cells*. Springer Berlin Heidelberg, 249-282.
  49. Nayernia, K., Lee, J. H., Drusenheimer, N., Nolte, J., Wulf, G., Dressel, R. y Engel, W. (2006). Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest*, 86(7), 654-663.
  50. Parker, K. L., Schimmer, B. P. y Schedl, A. (1999). Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Life Sci*, 55(6-7), 831-838.
  51. Rey, R. (2001). Diferenciación sexual embrio-fetal: De las moléculas a la anatomía. *Int J Morphol*, 9(1), 75-82.
  52. Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* 11, 2600-2621.
  53. Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., y Meachem, S. J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol*, 205(2), 117-131.
  54. Saffman, E. E., y Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci*, 55(8), 1141-1163.
  55. Saunders, P. T., Turner, J. M., Ruggiu, M., Taggart, M., Burgoyne, P. S., Elliott, D., y Cooke, H. J. (2003). Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. *Reproduction*, 126(5), 589-597.
  56. Saxena, R., de Vries, J. W., Repping, S., Alagappan, R. K., Skaletsky, H., Brown, L. G., y Page, D. C. (2000). Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics*, 67(3), 256-267.
  57. Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., y Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125(6), 769-784.
  58. Silva, C., Wood, J. R., Salvador, L., Zhang, Z., Kostetskii, I., Williams, C. J. y Strauss, J. F. (2009). Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone. *Mol Reprod Dev*, 76(1), 11-21.
  59. Sluka, P., O'Donnell, L., Bartles, J. R. y Stanton, P. G. (2006). FSH regulates the

- formation of adherent junctions and ectoplasmic specializations between rat Sertoli cells *in vitro* and *in vivo*. *J Endocrinol*, 189(2), 381-395.
60. Stevenson, A., Obaíd, M., Romina, R., y Vigneaux, L. (2016). Caracterización y Marcación de Células Germinales Primordiales. *Int J Morphol*, 34(2), 628-636.
  61. Surani, M. A., Ancelin, K., Hajkova, P., Lange, U. C., Payer, B., Western, P., y Saitou, M. (2004, January). Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 69, pp. 1-10). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  62. Sutovsky, P., y Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 1-30. Cambridge University Press.
  63. Swain, A., y Lovell-Badge, R. (1999). Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*, 13(7), 755-767.
  64. Vallee, M., Côté, J. F., y Fradette, J. (2009). Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol*, 57(4), 309-317.
  65. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7), 1-34.
  66. Vater, C., Kasten, P., y Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 7(2), 463-477.
  67. Vincent, S. D., Dunn, N. R., Sciammas, R., Shapiro-Shalef, M., Davis, M. M., Calame, K., y Robertson, E. J. (2005). The zinc finger transcriptional repressor *Blimp1/Prdm1* is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development*, 132(6), 1315-1325.
  68. Visintin, J. A., Mendes, C. M., Goissis, M. D., Kerkis, I. (2013). Diferenciação de gametas *in vitro* a partir de células-tronco. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, 37 (2), 140-144.
  69. Wang, H., Wang, H., Xiong, W., Chen, Y., Ma, Q., Ma, J., y Han, D. (2006). Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells *in vitro* through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction*, 132(3), 485-492.
  70. Wei, X., Peng, G., Zheng, S., y Wu, X. (2012). Differentiation of umbilical cord



- mesenchymal stem cells into steroidogenic cells in comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*, 45(2), 101-110.
71. Xie, L., Lin, L., Tang, Q., Li, W., Huang, T. Huo, X., y Ma, L. (2015). Sertoli cell-mediated differentiation of male germ cell-like cells from human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in an in vitro co-culture system. *Eur J Med Res*, 20(1), 9.
  72. Xu, H., Li, M., Gui, J. y Hong, Y. (2007). Cloning and expression of medaka DAZL during embryogenesis and gametogenesis. *Gene Expr Patterns*, 7(3), 332-338.
  73. Yalan, A. A. C., Díaz, H. N. R., y Aguirre, J. F. C. (2010). Células mesenquimales estromales. *Horiz Med*, 10(2).
  74. Yen, P. H., Chai, N. N., y Salido, E. C. (1997). The human DAZ genes, a putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions. *Mamm Genome*, 8(10), 756-759.
  75. Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., y Höög, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol cell*, 5(1), 73-83.
  76. Zhao, G. Q., Deng, K., Labosky, P. A., Liaw, L., y Hogan, B. L. (1996). The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev*, 10(13), 1657-1669.
  77. Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., y Wu, G. D. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cell*, 24(4), 928-935.