

Caracterización y potencial biotecnológico de las células madre adultas bovinas

Kevin. Yaneselli¹, Eugenia. Iglesias¹, Noelia. Vázquez² Agustina. Algorta¹

1- Unidad de Inmunología e Inmunoterapia, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar), Montevideo 10097, Uruguay.

2- Unidad de Anatomía, Departamento de Biociencias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar), Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

El tejido adiposo ha sido descrito como fuentes de células madre adultas en ruminantes, en particular el aislamiento de células estromales mesenquimales multipotentes en bovinos, del inglés *mesenchymal stromal/stem cells* (MSC). Sin embargo, a nivel nacional no existen antecedentes reportados de su aislamiento y caracterización, es de suma importancia su exploración a nivel local para el desarrollo biotecnológico tanto terapéutico como de producción de “carnes cultivadas”. El objetivo del trabajo fue aislar y caracterizar a las MSC bovinas derivadas de tejido adiposo. Para ello, se aislaron MSC de grasa tomada *post-mortem* de 10 animales. Se realizó el aislamiento mediante digestión enzimática y cultivo en condiciones estándar. Para comprobar su multipotencialidad *in vitro* se realizó la inducción a los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico. Los resultados obtenidos fueron el aislamiento de MSC presentando una morfología del tipo fusiforme, adherencia al plástico, capacidad clonogénica y crecimiento en monocapa en condiciones de cultivo. Asimismo, presentaron multipotencialidad *in vitro* mostrando la capacidad de tridiferenciación a los tres linajes inducidos. En conclusión, fue posible el aislamiento, expansión y mantenimiento del cultivo de MSC bovinas con multipotencialidad *in vitro*. Como perspectiva, este trabajo abre la posibilidad de profundizar trabajos nacionales de investigación en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

SUMMARY

Adipose tissue has been described as a source of adult stem cells in ruminants, particularly the isolation of bovine multipotent mesenchymal stromal/stem cells (bMSCs). However, at the national level there are no reported antecedents of its isolation and characterization, its exploration at the local level is of the utmost importance for the biotechnological development, both therapeutic and for the production of “cultured meats”. The aim of the

work was to isolate and characterize bMSCs derived from adipose tissue. To do this, MSCs were isolated from fat taken *post-mortem* from 10 animals. Isolation was performed by enzymatic digestion and culture under standard conditions. In order to verify its *in vitro* multipotency, induction of the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages was performed. The results obtained were the isolation of bMSCs presenting a spindle-type morphology, adherence to plastic, clonogenic capacity and monolayer growth under culture conditions. Likewise, they presented *in vitro* multipotency showing the capacity of differentiation to the trilineage induced. In

conclusion, it was possible to isolate, expand and maintain the culture of bMSCs with *in vitro* multipotency. As a perspective, this work opens the possibility of deepening national research work in different biotechnological applications.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un gran interés por el estudio de las células madre adultas provenientes de bovinos, en especial en las células estromales mesenquimales, del inglés *mesenchymal stromal/stem cells* (MSC). Este interés se debe a que poseen propiedades como la multipotencialidad *in vitro*, permitiéndoles diferenciarse en tejido adulto derivados del mesoderma como tejido adiposo, cartilaginoso y óseo (Sampaio et al., 2015; Yaneselli et al., 2018; Y. Zhao et al., 2012). Asimismo, poseen capacidad de inmunomodulación en el receptor de terapia celular y también poder antimicrobiano (Cahuascano et al., 2019). Estas características han impulsado nuevos estudios explorando su uso terapéutico en mastitis, en condiciones experimentales se vio una reducción en el recuento bacteriano en leche en animales tratados con MSC en comparación a los no tratados (Peralta et al., 2020). Por otra parte, debido a la capacidad de diferenciarse en el linaje miogénico, células capaces de formar músculo, existen estudios que exploran el potencial de producir “carnes cultivadas” partiendo de células madre

aisladas en el laboratorio, con el propósito de que sean utilizadas para el consumo humano (Skrivergaard et al., 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron aisladas MSC derivadas de tejido adiposo provenientes de 10 bovinos (*Bos taurus*), 2 meses de edad, cruce de raza Holstein. El tejido adiposo de la región abdominal fue tomado *post-mortem* de la carcasa. Fueron recolectados entre 8-10 gramos del tejido con pinza estéril y conservados en medio de transporte refrigerado. La eutanasia de los animales con la aprobación de la comisión de bioética correspondiente a la identificación CEUA-FVET n° 685. Las muestras fueron cortadas en trozos pequeños y posteriormente sometidas a una digestión enzimática con colagenasa tipo I durante 40 minutos. Luego de la digestión, se centrifugó a 600 g durante 10 minutos y retiro el sobrenadante. Entonces, el pellet resultante fue resuspendido en medio de crecimiento compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 20% de suero fetal bovino, 2% de antibiótico, incubado a 37°C con 5% CO₂. Cada 3-4 días fue cambiado el medio de crecimiento hasta que las células alcanzaban el 80% de confluencia era levantadas y criopreservadas. Asimismo, se comprobó su capacidad clonogénica a través de la prueba de unidades formadoras de colonias fibroblásticas y multipotencialidad en los linajes óseo, adiposo y cartilaginoso. Todos los protocolos utilizados fueron adaptados de lo descrito por Yaneselli y col. (2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consiguió el aislamiento y expansión *in vitro* de las MSC bovinas provenientes de tejido adiposo. Las mismas presentaron morfología fibroblástica, adherencia al plástico y capacidad de formar colonias fibroblásticas (Fig 1). Existen diferentes publicaciones que coinciden en las características de estas células aisladas de tejido adiposo (Lu, Xiong, et al., 2014), y otras fuentes como médula ósea (Lu, Huang, et al., 2014). Por otra parte, en este caso fue posible el aislamiento celular a pesar

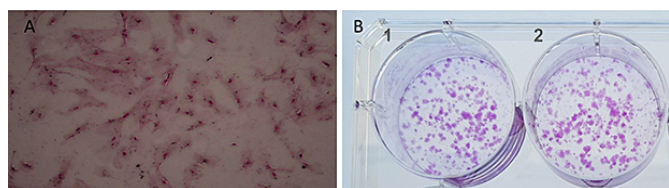


Figura 1. Cultivo de células estromales mesenquimales (MSC) bovinas. A) Imagen microscópica de MSC cultivadas en botella de cultivo (10x) teñidas con Giemsa. B) Imagen macroscópica de colonias formadas por las MSC en placa de cultivo y teñidas con Giemsa.

de que fueron extraídas *post-mortem*, coincidiendo con lo descrito por otros autores que también toman muestras de animales muertos (Y. Zhao et al., 2012), lo que significa una gran ventaja ya que a partir de la faena industrial para la producción de carne vacuna se puede obtener una gran cantidad de muestras aprovechan la cadena productiva y evitar el uso de donantes vivos.

Se pudo comprobar su multipotencialidad *in vitro* detectando la diferenciación en linaje adiposo, cartilaginoso y óseo (Fig 2). Esta comprobación de tridiferenciación está alineada con las recomendaciones internacionales sobre los mínimos criterios que se deben determinar para comprobar que las células aisladas son MSC multipotentes (Dominici et al., 2006). Además, diversos estudios comprueban la capacidad de tridiferenciación al igual que nuestro trabajo en MSC bovinas (X. X. Zhao et al., 2018; Y. Zhao et al., 2012).

CONCLUSIONES

Se puede concluir que fue posible el aislamiento y caracterización inicial de las MSC bovinas provenientes de tejido adiposo. Asimismo, la extracción *post-mortem* permite obtener células viables y su posterior subcultivo *in vitro*. Las MSC aisladas presentaron características de células multipotentes con su comprobación *in vitro* a través de la tridiferenciación a linaje adiposo, cartilaginoso y óseo. Las perspectivas de este incipiente trabajo a nivel nacional permiten contar con MSC bovinas caracterizadas que podrían ser usadas para explorar su potencial terapéutico e industrial.

BIBLIOGRAFÍA

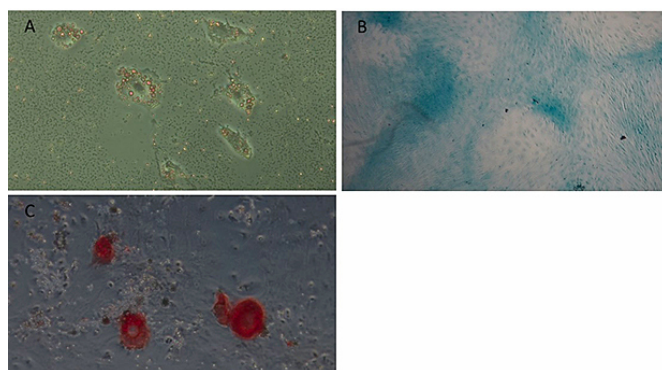


Figura 2. Prueba de multipotencialidad *in vitro* de las de células estromales mesenquimales (MSC) bovinas. A) Imagen de MSC inducidas al linaje adipogénico (40x) donde se visualizan vesículas lipídicas intracelulares teñidas con Oil Red. B) Imagen de inducción condrogénica (4x) donde se visualiza depósito de matriz cartilaginosa con afinidad al colorante Alcian Blue. C) Imagen de inducción osteogénica (4x) donde se visualiza de coloración rojiza de Alizarin Red debido a la afinidad por el depósito de matriz mineralizada.

Cahuascanco, B., Bahamonde, J., Huaman, O., Jarvis, M., Cortez, J., Palomino, J., Escobar, A., Retamal, P., Torres, C. G., & Peralta, O. A. (2019). Bovine fetal mesenchymal stem cells exert antiproliferative effect against mastitis causing pathogen *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research*, *50*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0643-1>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Lu, T., Huang, Y., Wang, H., Ma, Y., & Guan, W. (2014). Multi-lineage potential research of bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) from cattle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(1), 21–35. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0458-x>

Lu, T., Xiong, H., Wang, K., Wang, S., Ma, Y., & Guan, W. (2014). Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *174*(2), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1128-3>

Peralta, O. A., Carrasco, C., Vieytes, C., Tamayo, M. J., Muñoz, I., Sepulveda, S., Tadich, T., Duchens, M., Melendez, P., Mella, A., & Torres, C. G. (2020). Safety and efficacy of a mesenchymal stem cell intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* clinical mastitis. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59724-7>

Sampaio, R. V., Chiaratti, M. R., Santos, D. C. N., Bressan, F. F., Sangalli, J. R., Sá, A. L. A.,

Silva, T. V. G., Costa, N. N., Cordeiro, M. S., Santos, S. S. D., Ambrosio, C. E., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Miranda, M. S., & Ohashi, O. M. (2015). Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: Isolation, characterization, and multipotentiality. *Genetics and Molecular Research*, *14*(1), 53–62. <https://doi.org/10.4238/2015.January.15.7>

Skrivervgaard, S., Rasmussen, M. K., Therkildsen, M., & Young, J. F. (2021). Bovine Satellite Cells Isolated after 2 and 5 Days of Tissue Storage Maintain the Proliferative and Myogenic Capacity Needed for Cultured Meat Production. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8376. <https://doi.org/10.3390/ijms22168376>

Yaneselli, K., Campbell, V., Algorta, A., Bonfiglio, C., Mirazo, J., Fernández, S., Ríos, M., Llambí, S., & Maisonnave, J. (2018). Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, *54*(209), 14–19. <https://doi.org/10.29155/vet.54.209.3>

Zhao, X. X., An, X. L., Zhu, X. C., Jiang, Y., Zhai, Y. H., Zhang, S., Cai, N. N., Tang, B., Li, Z.

Y., & Zhang, X. M. (2018). Inhibiting transforming growth factor- β signaling regulates in vitro maintenance and differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *330*(8), 406–416. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22836>

Zhao, Y., Waldman, S. D., & Flynn, L. E. (2012). The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs*, *195*(5), 414–427. <https://doi.org/10.1159/000329254>