



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES CANINAS DERIVADAS DE TEJIDO  
ADIPOSO (CMM-TA) EXTRAÍDAS DE DOS SITIOS  
ANATÓMICOS DIFERENTES**

**Evaluación Del Efecto De Diferentes Fuentes De Extracción De  
Tejido Adiposo Y Pasajes Celulares Sobre La Habilidad  
Proliferativa, Inmunofenotipificación Y Multipotencialidad *In Vitro*  
De Las Células Madre Mesenquimales Caninas**

**KEVIN MATÍAS YANESELLI GONZÁLEZ**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY  
2015**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES CANINAS DERIVADAS DE TEJIDO  
ADIPOSO (CMM-TA) EXTRAÍDAS DE DOS SITIOS  
ANATÓMICOS DIFERENTES**

**Evaluación Del Efecto De Diferentes Fuentes De Extracción De  
Tejido Adiposo Y Pasajes Celulares Sobre La Habilidad  
Proliferativa, Inmunofenotipificación Y Multipotencialidad *In Vitro*  
De Las Células Madre Mesenquimales Caninas**

**KEVIN MATÍAS YANESELLI GONZÁLEZ**

---

**Dra. Jacqueline Maisonnave**

---

**Dra. Silvia Llambí**

---

**Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima**

**2015**

**(Esta hoja se completará una vez se defienda la Tesis y se apruebe)**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**AÑO  
2015**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL  
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

**En esta hoja va el Informe del Tribunal**

## **AGRADECIMIENTOS**

En el período de dos años he recorrido un lindo camino para realizar el presente trabajo. Tuve la fortuna de conocer muchas personas que me han acompañado en este largo y arduo recorrido para crecer académicamente y personalmente.

En primer lugar agradezco a mi familia por el apoyo incondicional en este largo emprendimiento de ser un profesional universitario y ahora en mi perfeccionamiento de posgrado. Cuando en cumpleaños u otros eventos familiares me he tenido que ausentar por motivos de estudio, trabajo o intercambio en el exterior, siempre he recibido el apoyo incondicional de ellos, muchas gracias a mis padres y hermano.

A mi co-orientadora profesora Dra. Elizabeth Cirne-Lima “Betty” por gentilmente recibirme en su laboratorio, integrarme a su grupo de trabajo y enseñarme muchas cosas a nivel profesional y personal. Con la amabilidad y hospitalidad que caracteriza a los brasileños. Además de estar profundamente agradecido con todo su equipo compuesto por Critiana Kuhl, Paula Terraciano, Fernanda de Oliveira, Sabrina Pizzato, Kamila Panzza, Alessandra Magrisso, Cristina Messias, Laura Ayres y el profesor Eduardo Pandolfi Passos por convivir el día a día de trabajo, ayudarme y aceptarme como su compañero y amigo.

Rescato muchas cosas académicas de mi intercambio en el contexto de mi maestría pero más importante es la parte humana que dejo en mí. Agradezco a todas las personas que formaron parte de mi vida cuando estaba en Brasil, los cuales fueron un empujón anímico fundamental para seguir adelante.

Estoy sumamente agradecido a los Drs. Uruguaysito Benavides y Rodrigo Puentes, siempre recibí el total apoyo para realizar parte de mi posgrado fuera del país, teniendo que cargar aún más sus ajustadas agendas para cubrir mi ausencia. Además de conformar un excelente grupo de trabajo en el Área Inmunología.

A la profesora Dra. Silvia Llambí que como co-orientadora siempre me ha ayudado y dado excelentes consejos sobre mi investigación. Siempre dispuesta a colaborar y escuchar nuevas ideas para desarrollar.

Y por último pero no menos importante, a mi orientador la profesora Dr. Jacqueline Masonnave. Ha sido la persona que me ha marcado el camino a recorrer desde el año 2008 como ayunante honorario y docente del Área Inmunología, orientadora de tesis de grado y maestría. En pocas palabras, ella me ha mostrado lo que es ser investigador, docente y un buen profesional. Además de inculcarme esa curiosidad por lo desconocido y a no tener miedo en ir “mar adentro” en la investigación para responder mis incógnitas.

## Listado de Abreviaturas

AND	Ácido desoxirribonucleico
ADAS	<i>Adipose-derived adult stem cells</i>
ADSC/ASC	<i>Adipose derived stem cells</i>
Ang-1	<i>Angiopoietin-1</i>
APC	Aloficocianina
AT-MSC/A-MSC	<i>Adipose-tissue mesenchymal stem cells</i>
ATB	Antibiótico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BrdU-5	<i>Bromo-2'-deoxy-uridine</i>
CFU-F	<i>Colony forming units-fibroblastic</i>
CM	Células madre
CMA	Células madre adultas
CME	Células madre embrionarias
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMH-CP	Células madre hematopoyéticas a corto plazo
CMH-LP	Células madre hematopoyéticas a largo plazo
CMM	Células madre mesenquimales
CMM-MO	Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea
CMM-TA	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
CMM-TA SC	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo extraídas de la región subcutánea
CMM-TA VS	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo extraídas de la región visceral
cpdl	<i>Cumulative population doubling level</i>
CU	Cordón umbilical
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ES	<i>Embryonic stem (ES) cells</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FVE	Fracción vascular estromal
HLA-g	<i>Human leukocyte antigen type g</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IDO	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IL6	Interleuquina 6
IL8	Interleuquina 8
IL10	Interleuquina 10
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor</i>
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
iPS	<i>induced Pluripotent Stem (iPS) cells</i>
ISCT	<i>International Society of Cellular Therapy</i>
GVHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
LL-37	Catelicidina
MADS	<i>Multipotent adipose-derived stem cells</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M2	Activación alternativa de macrófagos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
MHCI	<i>Major histocompatibility complex I</i>
MHCII	<i>Major histocompatibility complex II</i>
MO	Médula ósea
MSC	<i>Mesenchymal stem cells-Multipotent mesenchymal stromal cell-Mesenchymal stem/stromal cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Ficoeritrina



PLA	<i>Processed lipoaspirate cells</i>
PLGF	<i>Placental growth factor</i>
SC	Subcutáneo
SDF1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SFB	suero fetal bovino
TA	Tejido adiposo
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UFC-B	Unidades formadoras de colonia de bazo
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VS	Visceral
Vs	<i>Versus</i>

## **Listado de Cuadros**

Cuadro I. Inmunofenotipificación de las CMM-TA SC y VS P <sub>4</sub> , P <sub>6</sub> y P <sub>8</sub> .....	24
Anexo I: Cuadro I. Habilidad proliferativa de las CMM-TA en P <sub>0</sub> .....	53
Anexo II: Cuadro II. Habilidad proliferativa de las CMM-TA en P <sub>1</sub> - P <sub>3</sub> .....	53
Anexo IV: Cuadro III: Porcentaje de diferenciación adipogénica.....	55
Anexo IV: Cuadro IV: Porcentaje de diferenciación condrogénica.....	55
Anexo IV: Cuadro V: Porcentaje de diferenciación osteogénica.....	55

## Listado de Figuras

Figura 1. Recuento de células viables del aislamiento de CMM-TA de las fuentes SC y VS.....	21
Figura 2. Imagen microscópica de las CMM-TA P <sub>2</sub> (40 X): A fuente SC. B. fuente VS.....	21
Figura 3. Habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS P <sub>0</sub> .....	22
Figura 4. Habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub> .....	22
Figura 5. Habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS.....	23
Figura 6. Citometría de flujo: caracterización de las CMM-TA P <sub>3</sub> de origen SC y VS.....	23
Figura 7. Tridiferenciación <i>in vitro</i> de CMM-TA P <sub>2</sub> .....	25
Figura 8. Evaluación del efecto de altos pasajes sobre la proporción de diferenciación <i>in vitro</i> de las CMM-TA de ambas fuentes.....	26
Figura 9. Comparación de la capacidad de síntesis de matriz ósea <i>in vitro</i> de las CMM-TA SC y VS P <sub>4</sub> .....	26
Figura 10. Comparación de la capacidad de síntesis de matriz ósea <i>in vitro</i> en diferentes pasajes (P <sub>4</sub> , P <sub>6</sub> y P <sub>8</sub> ) de las CMM-TA SC.....	27
Anexo IV: Figura 1. Citometría de flujo de las CMM-TA SC y VS P <sub>4</sub> , P <sub>6</sub> y P <sub>8</sub> .....	54

## INDICE

Agradecimientos.....	I
Listado de Abreviaturas.....	II
Listado de Cuadros.....	IV
Listado de Figuras.....	V
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Células madre (CM): origen y propiedades.....	1
1.1.1 Células madre totipotentes.....	1
1.1.2 Células madre pluripotentes.....	2
1.1.3 Células madre multipotentes.....	5
1.2 Características de las células madre mesenquimales (CMM).....	8
1.2.1 Nomenclatura de las CMM.....	8
1.2.2 Fuentes de extracción de las CMM.....	8
1.2.3 Características <i>in vitro</i> de las CMM.....	9
1.3 Perspectivas del uso terapéutico de las CMM.....	12
1.3.1 Principales usos terapéuticos en animales domésticos como modelo animal y/o paciente veterinario.....	12
1.3.2 Iniciativa de “Una Salud” ( <i>One health</i> ).....	14
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	15
2.1 Estructura del TA.....	15
2.2 Fuentes de CMM-TA y sus características.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	17
3.1 Hipótesis.....	17
3.2 Objetivo general.....	17
3.3 Objetivos específicos.....	17
4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Animales.....	18
5.2 Aislamiento y expansión de CMM-TA.....	18
5.2.1 Extracción de TA.....	18
5.2.2 Aislamiento de CMM-TA.....	18
5.2.3 Cultivo de CMM-TA.....	19

5.3 Nivel de habilidad proliferativa celular.....	19
5.4 Determinación de los antígenos de superficie celular.....	19
5.5 Tridiferenciación <i>in vitro</i> .....	19
5.6 Cuantificación de matriz ósea <i>in vitro</i> .....	20
5.7 Análisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS.....	20
6.1 Aislamiento de CMM-TA.....	20
6.2 Nivel de habilidad proliferativa celular.....	21
6.3 Determinación de los antígenos de superficie celular.....	23
6.4 Tridiferenciación <i>in vitro</i> .....	24
6.5 Cuantificación de matriz ósea <i>in vitro</i> .....	25
7. DISCUSIÓN.....	27
8. CONCLUSIONES.....	31
9. PERSPECTIVAS.....	31
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
11. ANEXOS.....	53
Anexo I: Cuadro I. Habilidad proliferativa de las CMM-TA en P <sub>0</sub> .....	53
Anexo II: Cuadro II. Habilidad proliferativa de las CMM-TA en P <sub>1</sub> - P <sub>3</sub> .....	53
Anexo III: Figura 1. Citometría de flujo de las CMM-TA SC y VS P <sub>4</sub> , P <sub>6</sub> y P <sub>8</sub> .....	54
Anexo IV: Tridiferenciación <i>in vitro</i> .....	55

## RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) presentan características atractivas para su uso terapéutico, como multipotencialidad, inmunomodulación, angiogenicidad, migran al foco inflamatorio (*homing*) y antimicrobianas. Es importante profundizar sobre sus características *in vitro* para poder optimizar su potencial terapéutico en estudios preclínico (modelo animal) y en medicina veterinaria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las diferencias de las CMM caninas derivadas de tejido adiposo (TA) de las fuentes subcutánea (SC) y visceral (VS) en relación a su habilidad de proliferación, inmunofenotipificación y multipotencialidad *in vitro*. Fue estudiada la habilidad de proliferación de CMM-TA SC y VS de caninos en bajos pasajes (P<sub>0</sub>-P<sub>3</sub>). Para caracterizar las CMM fueron inmunofenotipificadas y tridiferenciadas *in vitro*. Se evaluó la variación de la plasticidad de diferenciación *in vitro*, de la capacidad de sintetizar matriz ósea *in vitro* y de los marcadores antigénicos de superficie, en diferentes pasajes (P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>). En el P<sub>0</sub> presentaron similar habilidad proliferativa en ambas fuentes de TA. En cambio, se observó una alta capacidad proliferativa de las CMM-TA SC en P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> comparado con la fuente VS. Las CMM-TA de ambas fuentes presentaron los marcadores CD44+, CD90+ y no el CD45-. Fue posible tridiferenciar *in vitro* (adiposo, cartilaginoso y óseo) para ambos linajes. La CMM-TA SC preserva su multipotencialidad *in vitro* hasta el P<sub>8</sub>, en cambio la fuente VS hasta el P<sub>4</sub>. Además, la fuente SC presenta mayor capacidad de síntesis de matriz ósea *in vitro*. En conclusión, la fuente SC posee ventajas sobre la VS, debido a que las CMM-TA presentan mayor habilidad proliferativa, preservan su plasticidad *in vitro* mayor número de pasajes, tiene mayor capacidad de sintetizar matriz ósea *in vitro* y su extracción es menos invasiva. Describimos por primera vez un método alternativo para evaluar la habilidad proliferativa de las CMM-TA, determinando tiempo y cantidad final de células cosechadas. Nuevas investigaciones deberían ser abordadas para evaluar si las diferencias *in vitro* se mantiene *in vivo* cuando son aplicadas las CMM-TA con fines terapéuticos.

## SUMMARY

Mesenchymal Stem Cells (MSC) have attractive characteristics for tissue regeneration, as multidifferentiation, immunomodulation, migration to the inflammatory niche (homing), angiogenesis and antimicrobial potential. It is important to continue studying *in vitro* characteristics, in order to improve therapeutic applications in preclinical studies (animal models) and veterinary medicine. The objective of this work was to evaluate the differences of the subcutaneous (Sc) and visceral (Vs) adipose-derived stem cells (ASC), in expression of surface markers and its ability to multidifferentiate and proliferate *in vitro*. In order to characterize the MSC they were immunophenotyped and *in vitro* tridifferentiated. The proliferation ability of Sc and Vs canine ASC in low passages (P<sub>0</sub>-P<sub>3</sub>) was studied. The differentiation plasticity, extracellular mineral deposits and the expression of canine MSC cell surface markers was also evaluated in different passages (P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>). ASC of both sources in P<sub>0</sub> showed similar proliferative abilities. But Sc-ASC in P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> showed a higher proliferative capacity than Vs. The ASC of both sources expressed surface markers CD44+ and CD90+ and did not CD45-. Both ASC sources differentiated into adipose, chondrogenic and bone tissues. Sc-ASC preserves its multipotentiality up to P<sub>8</sub> and Vs only up to P<sub>4</sub>. Moreover, the ASC of Sc source have more advantages as they present a higher capacity of bone matrix synthesis *in vitro*, have a higher proliferative ability, conserves its plasticity during more passages and the collection procedures are less invasive. We describe for the first time an alternative method to evaluate the proliferative ability of the ASC, recording the time and number of harvested cells. New research is needed in order to evaluate if the ASC conserve the *in vitro* differences *in vivo* when therapeutically applied.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Células madre (CM): origen y propiedades

A pesar de la diversidad de células que pueden ser reconocidas en el tejido adulto, todas derivan de una única célula-ovo resultante de la fecundación del óvulo por el espermatozoide. Esta célula tiene la capacidad de dar origen al embrión y finalmente al individuo adulto. En esta etapa la célula-ovo es denominada célula madre totipotente porque posee la plasticidad de generar un nuevo embrión y anexos embrionarios. Ella se multiplica para dar origen al embrión, para ello grupos celulares que van adquiriendo especialización, paulatinamente en este proceso van perdiendo la plasticidad de diferenciación (Zago, 2007).

En el tejido adulto existen reservas de células con capacidad de multiplicarse, diferenciarse en el tejido de residencia. Estas son denominadas células madre adultas (CMA) responsables del mantenimiento de la integridad de los tejidos adultos, por la reparación o remodelación de los tejidos u órganos.

Las CM se diferencian de otras células del organismo por presentar tres características: células indiferenciadas, capaces de multiplicarse por un período largo de tiempo manteniéndose indiferenciadas y capaces de diferenciarse en un tipo de célula especializada para un tejido en particular. Es decir, las CM son capaces presentar divisiones asimétricas, pudiendo dar origen a células indiferenciadas, reponiendo el *pool* de CM, o alternativamente pueden diferenciarse en células especializadas. Las CMA, pueden ser denominadas células madre somáticas (*soma*=cuerpo). Ellas tienen la capacidad limitada de diferenciarse, en general es restringida al tejido de origen, por lo general dan origen a un único o algunos tipos celulares diferenciados y son clasificadas como CMA unipotentes o multipotentes (Covas, 2007).

Las CM pueden clasificarse de dos maneras: a) Según el tejido de origen que son extraídas pueden ser células madre embrionarias o adultas; b) Según su plasticidad de diferenciación son células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. La primera clasificación se acopla los procesos biológicos de ontogénesis, y la plasticidad de las CM va disminuyendo gradualmente a la vez que un ser vivo avanza en etapas del desarrollo. Sin embargo, debido al desarrollo de nuevas técnicas moleculares que permiten la reprogramación celular, a partir de una célula adulta comprometida con un linaje puede ser “reseteada” y recobrar su estado de progenitora pluripotente. Estos grandes avances científicos indican que es conveniente clasificarlas por su grado de plasticidad, por eso es adoptada en el presente trabajo (Takahashi & Yamanaka 2006; Covas, 2007; Zago, 2007).

### 1.1.1 Células madre totipotentes

Después de la fertilización de los gametos óvulo-espermatozoide, ocurre la generación de una célula-ovo que va a dar origen a toda la diversidad de células especializadas de un organismo adulto (Hemberger et al. 2009; Bošković et al. 2014). Es el estado de mayor plasticidad de una célula ya que por sí sola es capaz de dar origen a los tres linajes embrionarios y a los anexos embrionarios. A medida que avanzan etapas embrionarias los grupos celulares van adquiriendo especialización y paulatinamente van perdiendo la plasticidad de diferenciación. La



diferencia que existe con las células pluripotentes es que estas últimas no son capaces de generar anexos embrionarios para generar un nuevo organismo (Hemberger et al. 2009; Bošković et al. 2014).

### 1.1.2 Células madre pluripotentes

Son un linaje celular inespecializado, sin límite de autorenovación y una alta plasticidad, es decir son capaces de dar origen a más de 250 tipos celulares diferentes de tejido adulto. Son obtenidas a partir del embrión en su fase precoz de desarrollo o de tejido adulto. Comprende células derivadas del embrión, del feto, de un tipo de hibridación en un proceso llamado transferencia de núcleo somático (clonaje) o por medio de la reprogramación celular (Pereira, 2007).

Las células madre embrionarias (CME) conocidas en la literatura internacional como ES (del inglés, *embryonic stem (ES) cells*): cuando el óvulo es fecundado por el espermatozoide, esta célula sufre repetidas divisiones formando el embrión, el cuál se va a implantar en el útero para desarrollarse hasta sus etapas finales y dar origen al feto y finalmente a un individuo adulto. En la fase inicial se forma una estructura embrionaria denominada blastocisto, compuesta por una masa celular externa e interna. Las células de la masa interna dan origen al feto y los tejidos extrafetales, mientras que la externa da origen a algunos tejidos pertenecientes a la placenta (trofoectodermo). Estas células de la masa interna pueden ser retiradas y cultivadas, dando origen al linaje de CME, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en los diferentes tipos de tejido adulto (Thomson et al. 1998; Pereira, 2007). Existen otra fuente de CME como las células germinales embrionarias, las obtenidas por clonaje o reprogramación.

Para denominarlas CME se debe comprobar *in vitro* su alta capacidad de autorenovación, realizando gran cantidad de pasajes celulares sin que su estabilidad cromosómica se vea alterada y presentar alta actividad de la telomerasa, otro aspecto que se debe comprobar su pluripotencialidad a través de la formación del cuerpo embrioide, diferenciación *in vitro* en los tres linajes embrionarios e *in vivo* con la formación de teratoma, contribución a quimerismo y subsecuente transmisión germinal (Thomson et al. 1998; Vaags et al. 2009; Kumar et al. 2015).

Para comprobar su alto poder de autorenovación son realizados sucesivos pasajes celulares por largos períodos de tiempo, es decir mayores del pasaje 30 (>P<sub>30</sub>) (Thomson et al. 1998; Takahashi & Yamanaka, 2006). Al mismo tiempo, se determina su estabilidad cromosómica a través de la evaluación del cariotipo. Principalmente son usados marcadores genéticos para identificar las CME como: Oct3/4, Nanog, E-Ras, Cripto, Dax, Sox2, Zfp296 (Mitsui et al. 2003) y Fgf4 (Yuan et al. 1995) característicos de las CME.

Para comprobar su pluripotencialidad *in vivo* las CME son inyectadas por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes y debe formarse un teratoma. Histológicamente se deben observar tejidos derivados de los tres linajes germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo). En cambio, *in vitro* se puede observar la diferenciación espontánea en diversos linajes celulares cuando son cultivados con o sin “*feeder layer*” de fibroblastos (Thomson et al. 1998). Para comprobar la capacidad de quimerismo se deben inyectar las CME en un blastocito de ratón y

deben ser capaces de generar un nuevo embrión viable con la información genética de las células utilizadas.

Las primeras CME descritas fueron aisladas en ratones (Evans & Kaufman 1981; Martin, 1981), luego humanos (Thomson et al. 1998). Posteriormente, en caninos aparecen las primeras descripciones de células tipo CME, pero con la dificultad que no se podía mantener su linaje durante alta cantidad de pasajes con las características de CME (Hatoya et al. 2006; Schneider et al. 2007). Hasta que finalmente Vaags et al. (2009) consigue establecer un linaje de CME de origen canino cumpliendo con los criterios para demostrar que eran CME, conservando su pluripotencialidad en altos pasajes.

Otra forma de obtener CME artificialmente es a través de la técnica de clonaje (transferencia de núcleo somático). Esta técnica permite obtener una célula pluripotente a partir de una célula adulta. Consiste en transferir el núcleo de una célula adulta (por ejemplo, piel) a un óvulo. Esta célula hibridada puede ser estimulada a multiplicarse y originar una masa celular similar a la blástula del embrión normal. En los años 60 se consiguió trasplantar el núcleo de una célula intestinal adulta en un ovocito (Gurdon, 1962). Tres décadas más tarde, con éxito consiguen clonar a una oveja (Dolly) por transferencia de núcleo de una célula epitelial adulta en un ovocito anucleado, demostrando que una célula podía ser reprogramada (Wilmut et al. 2007). Este descubrimiento demostró que células diferenciadas adultas contienen la información genética necesaria para la ontogénesis de un mamífero y que el ovocito anucleado contiene los “factores fundamentales” para reprogramar el núcleo de una célula adulta. Sin embargo, en ese momento no fue posible elucidar cuáles eran los factores fundamentales que participan en el proceso de reprogramación.

Posteriormente, es revolucionada la fuente de obtención de células pluripotentes debido al trabajo de Takahashi & Yamanaka (2006), describen un proceso por el cual utilizando cuatro factores de reprogramación (factores fundamentales) es posible transformar una célula somática adulta en pluripotente, las cuales fueron denominadas células madre pluripotentes inducidas (del inglés, *induced Pluripotent Stem (iPS) cells*). Los cuatro factores de reprogramación utilizados fueron c-Myc, Klf4, Oct4 y Sox2 vehiculizados en un vector retroviral. Con este trabajo fue elucidada la incógnita de cuáles serían los potenciales factores fundamentales que participan en el clonaje para transformar una célula adulta (unipotente) en pluripotente.

Las primeras iPS generadas fueron de origen murino (Takahashi & Yamanaka, 2006) utilizando los cuatro factores: c-Myc, Klf4, Oct4 y Sox2. Subsecuentemente, fueron descritas las iPS humanas producidas a partir de fibroblastos adultos (Okita et al. 2007; Takahashi et al. 2007). Actualmente, han sido reprogramadas células de otras especies: macaco rhesus (Liu et al. 2008) y rata (Liao et al. 2009), como también especies domésticos: bovino (Han et al. 2011), caprino (Ren et al. 2011), canino (Shimada et al. 2010), cerdo (Esteban et al. 2009; West et al. 2011), equino (Nagy et al. 2011), ovinos (Bao et al. 2011; Sartori et al. 2012) o por último modelos animales no tradicionales: búfalo (Deng et al. 2012), leopardo (Verma et al. 2012), rinoceronte (Ben-Nun et al. 2011). Entonces, se puede transformar una célula somática adulta con las características de: uni o multipotente, con limitada diferenciación y sin capacidad de formar teratomas. Posteriormente de la

reprogramación se transforma en una iPS, las cuales poseen éstas características: autorenovación sin límite, pluripotencialidad comprobada *in vitro* e *in vivo*, contribución a quimerismo y subsecuente transmisión germinal. Para poder denominar a una célula iPS luego de su reprogramación es necesario comprobar las características mencionadas anteriormente.

Muchas iPS fueron generadas inicialmente a partir de vectores retroviral o lentiviral para la transducción de los factores de reprogramación. Con el inconveniente que se observaron múltiples integraciones del genoma viral en el huésped causando mutagénesis de inserción y aumentando el riesgo de formación de tumores (Kumar et al. 2015). Debido al riesgo que implicaba utilizar estos vectores fueron desarrollados otros métodos de reprogramación que no se integran al genoma de la célula huésped, de los que se destaca el uso de vectores virales que no se integran al genoma como son adenovirus (Stadtfield et al. 2008; Tashiro et al. 2009), Sendai virus (Fusaki et al. 2009) y vectores no virales: plásmido episomal (Okita et al. 2010; Yu et al. 2009), ADN minicircular (Jia et al. 2010), pequeñas moléculas (Despots & Ding, 2010), ARNm (Warren et al. 2010), proteínas recombinantes (Kim et al. 2009a) y transposones tipo *piggyBac* (Woltjen et al. 2009). Además se ha desarrollado la reprogramación en células de fuentes diversas como fibroblastos (Lowry et al. 2008), células pancreáticas (Stadtfield et al. 2008), leucocitos (Hanna et al. 2008), hepatocitos (Aoi et al. 2008), queratinocitos (Aasen et al. 2008), células progenitoras neuronales (Kim et al. 2009b), células sanguíneas del cordón (Takenaka et al. 2010). Esta información sugiere que muchos tipos de células adultas potencialmente son reprogramables a un estado de pluripotencia.

Los factores de reprogramación generalmente usados para obtener iPS: c-Myc, Klf4, Lin28, Oct4, Nanog y Sox2 (Takahashi & Yamanaka, 2006; Okita et al. 2007; Takahashi et al. 2007) controlan vías críticas de señalización celular para obtener la reprogramación celular. Existen muchos factores de transcripción de los que se destacan el Oct3/4 (Hitoshi et al. 1991; Nichols et al. 1998), Sox2 (Avilion et al. 2003) y Nanog (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003) que participan en el mantenimiento de la pluripotencialidad en etapas tempranas del embrión. Una cosa que sorprendió, fue que dentro de los factores de reprogramación fuera prescindible el Nanog por su importancia anteriormente mencionada. Brevemente, el Oct3/4 es el factor de regulación de pluripotencia más estudiado, las células en etapas embrionarias tempranas, promueven la transcripción de genes de células progenitoras denominados *stemness gene* (Wang & Dai, 2010). La proteína Oct3/4 colabora con los factores progenitores como Nanog y Sox2 (Wang & Dai, 2010). Sox2 es un factor de transcripción que coactiva el Oct3/4 (Chew et al. 2005). Unidos Oct3/4/Sox2 aumentan la transcripción de los genes Oct3/4 y Nanog (Masui et al. 2007). Nanog es un factor de transcripción que estabiliza la red de señalización celular de *stemness gene*. El factor de transcripción Klf4 regula la expresión de Oct4, Nanog y Sox2 (Chambers et al. 2003; Kim et al. 2008; Liao et al. 2009; Niwa et al. 2009). El c-Myc aumenta la eficiencia y velocidad de reprogramación (Nakagawa et al. 2010) y el Lin28 promueve la expresión de Oct3/4 a nivel postranscripcional uniéndose directamente al ARNm (Qiu et al. 2010). Aun no sé conoce si tiene alguna relevancia la especie para determinar cuáles son los factores de reprogramación adecuados. Actualmente, se ha conseguido reprogramar células de animales domésticos y salvajes adoptando los mismos factores usados en células de origen humano y murino. Esta información sugiere que existe una gran

conservación de los factores de reprogramación entre mamíferos (Rosselló et al. 2013; Kumar et al. 2015).

Las iPS surgen por muchos obstáculos científicos, éticos, religiosos referidos a trabajar con CME, principalmente en humanos. La alternativa de reprogramación para obtener células en estado de pluripotencia, ha sido una gran solución para sortear los problemas éticos y religiosos. Sin embargo, presenta desventajas como su baja eficiencia de reprogramación, mutagénesis de inserción, reactivación de transgenes silenciados y el riesgo de tumorigénesis que implica su utilización con fines terapéuticos (Walia et al. 2012). Por esta situación se ha desacelerado su investigación con fines terapéuticos directos, pero se exploran con gran interés dos campos para su potencial uso: 1) Contribución en el desarrollo de modelos de enfermedades (Lee et al. 2009b; Carette et al. 2010; Grskovic et al. 2011; Kumano et al. 2012; Kim et al. 2013a) y exploración de drogas (McLaren et al. 2012; Mertens et al. 2013; Xu et al. 2013); 2) Generación *in vitro* de gametos a partir de iPS para la preservación genética de especies en peligro de extinción o animales de alto valor genético (Ben-Nun et al. 2011; Verma et al. 2012; Zhu et al. 2012).

### 1.1.3 Células madre multipotentes

Son un linaje celular inespecializado, con moderado poder de autorenovación y moderada plasticidad. Dependiendo de la literatura describen que entre P<sub>6</sub> y P<sub>15</sub> comienzan a enlentecer su proliferación y pasan a estado de senescencia (Zuk et al. 2001; Martinello et al. 2011; Guercio et al. 2013), también su multipotencia es limitada porque puede diferenciarse apenas a linajes celulares especializados derivados de la misma línea germinal (endodermo, ectodermo o mesodermo) (Covas, 2007).

Células madre adultas (CMA): abordaremos las células más estudiadas en la literatura, las cuales son las células madre hematopoyéticas y mensenchimales.

#### Células madre hematopoyéticas (CMH)

Conocidas en la literatura internacional como HSC (del inglés, *hematopoietic stem cells*) son encargadas de mantener la hematopoyesis, manteniendo constante la renovación de elementos celulares sanguíneos. Las CMH poseen dos grandes características, la primera es que tienen la multipotencialidad de generar los linajes sanguíneos de la línea roja que produce los eritrocitos, la línea blanca que produce células de diferentes tipos como la linfocitos B y T, y la mieloide: basófilos, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, y monocitos. Además dan origen a la línea trombocítica que desarrolla megacariocitos y plaquetas. Segunda característica, las CMH tienen un alto potencial de autorenovación, es decir que son capaces de dividirse y producir un gran número de células progenitoras de diferentes linajes como también otras CMH por el fenómeno denominado división asimétrica (Nandi & Alfonso, 2007).

Las CMH son heterogéneas con respecto a su habilidad de autorenovarse, para distinguirlas se clasifican en células madre hematopoyéticas a largo plazo (CMH-LP) y corto plazo (CMH-CP). Las CMH-LP son capaces de producir todos los tipos de células maduras de la sangre durante la vida de un individuo y de generar células progenitoras que al ser trasplantadas pueden reconstituir el sistema hematopoyético del huésped. Estas CMH-LP constituyen menos del 0,1% de CMH contenidas en la médula ósea. Las CMH-CP son las encargadas de generar células progenitoras comprometidas con linaje como el linfocito o mieloide (Ivanova et al. 2002; Mayani,

Alvarado-Moreno et al. 2003; Bellantuono 2004). Parece ser que hay un compromiso progresivo de las CMH-LP en la generación de CMH-CP y de éstas a su vez en la generación de progenitores multipotentes pasando por varios estadios de diferenciación que implican cambios funcionales irreversibles y que caracterizan el proceso de maduración celular (Morrison et al. 1997; Weissman 2000).

EL principal nicho de las CMH es la médula ósea, las células se encuentran en el sector medular de los huesos largos. La médula ósea es un espacio que contiene hueso trabecular vinculado a células del estroma, lo que físicamente soportan y fisiológicamente mantienen el tejido hematopoyético (Panoskaltzis et al. 2005). El microambiente hematopoyético de la médula ósea contiene células del estroma cuyo origen puede ser mesenquimal, como es el caso de las células endoteliales, los fibroblastos, los adipocitos y los osteoblastos o puede ser hematopoyético como los macrófagos y las células dendríticas. Todas estas células del estroma producen y depositan elementos en la matriz extracelular. Además de esto son capaces de producir y concentrar citoquinas locales hematopoyéticas que pueden inducir o inhibir la proliferación y comprometer la diferenciación de las células progenitoras, formando así el “nicho de la células madre/ progenitoras” (Quesenberry et al. 1993).

#### Características de las CMH

Las CMH son multipotentes, capaces de diferenciarse en linajes hematopoyéticos *in vitro* e *in vivo*. Uno de los estudios destacados en describir propiedades de las CMH fue el de Till & McCulloch, (1961) quienes obtuvieron células hematopoyéticas de la médula o del bazo de ratones donadores y las trasplantaron a ratones previamente irradiados con dosis subletal, con el fin de destruir la hematopoyesis endógena y prevenir la generación de CMH del hospedero. Algunas células trasplantadas consiguieron sobrevivir y proliferar, alojándose principalmente en el bazo del receptor. Estas CMH trasplantadas eran capaces de formar colonias macroscópicas denominadas unidades formadoras de colonia de bazo (UFC-B). Estas colonias eran capaces de repoblar al hospedero con células del linaje hematopoyético, demostrando su multipotencia y poder de autorenovación. Es posible también observar estas características *in vitro* (Morrison et al. 1997; Nandi & Alfonso, 2007). Cuando son inmunofenotipificadas las CMH los principales marcadores de superficie: CD34+, CD38-, c-kit+Thy-1+ (Nandi & Alfonso, 2007).

#### Células madre mesenquimales (CMM)

Actualmente conocidas en la literatura internacional como MSC (del inglés, *mesenchymal stem cells*). Originalmente estas células fueron descritas por Friedenstein et al. (1970) que las denominaron células formadoras de colonias fibroblásticas, conocidas como CFU-F (del inglés, *colony forming units-fibroblastic*). En los años 90 crecieron exponencialmente los trabajos científicos sobre CMM para ser utilizadas en ingeniería de tejidos/medicina regenerativa por sus características de poseer multipotencialidad, ser inmunomoduladoras, promover la angiogénesis, efecto antimicrobiano y su fácil extracción de individuos adultos. Todas estas características hacen que se estudie su potencial uso en la regeneración de tejidos y patologías inmunomediadas (Covas, 2007).

La primera fuente de CMM descrita fue la médula ósea (MO), el primer trabajo descrito por Petrakoba et al. (1963) observaron que la MO tenía una subpoblación celular diferente a las CMH capaz de formar tejido óseo al ser trasplantar MO a nivel subcapsular del riñón en ratones. A continuación, los trabajos de Friedenstein

et al. (Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1970; Friedenstein et al. 1974) demostraron en diversos experimentos que esa subpoblación celular era CMM y que diferían de las CMH. Además de desarrollar un método de aislamiento de estas células estromales basado en su capacidad de adherencia al plástico que está vigente hasta el día de hoy como método estándar de aislamiento. Del conjunto de sus experimentos quedó demostrado que estas células proveniente de MO, denominadas CFU-F: a) constituían una población celular escasa de la MO (entre 0,001-0,01% de las células nucleares medulares); b) no estaban en fase S del ciclo celular antes de las 60 horas; c) poseían elevada capacidad de proliferación; d) eran clonogénicas; e) formaban colonias de densidades y formas irregulares; f) eran capaces de formar tejido óseo después de ser expandidas en cultivo *in vitro* (Covas, 2007). Posteriormente, con los trabajos de Owen (Owen, 1985; Owen, 1988) se propone que estas células CFU-F serían CM que originaban el estroma de la MO. Posteriormente, Caplan et al. (1991) propuso que estas CM aisladas de la MO de individuos adultos serían CMM provenientes del embrión. Además fue un paso más adelante y propuso que estas células serían candidatas para ser utilizadas terapéuticamente en tratamiento ortopédico, en la modalidad de terapia celular autóloga.

Las CMM-MO son extraídas de la cresta ilíaca, tibia, fémur, columna vertebral y esternón en humanos y grandes mamíferos. Las células obtenidas presentan adherencia al plástico y potencialmente consiguen expandirse a altos pasajes sin señales de senescencia. Estas células estromales son separadas de las células hematopoyéticas porque no son adherentes al plástico y son removidas con el cambio de medio de cultivo. Estudios de ciclo celular muestran que dentro de este *pool* de CMM tienen diferentes grados de especialización, la gran mayoría de las células están en fase G0-G1 del ciclo, sugiriendo un gran potencial de diferenciación *in vitro* (Covas, 2007).

Posteriormente, se descubre otra fuente de CMM provenientes del tejido adiposo (TA). En la literatura se comienza a mencionar con en el trabajo de Van & Roncari, (1977) que describen la presencia de un linaje celular con la capacidad de proliferar y diferenciarse en adipocito *in vitro* proveniente de TA murino. Indicando que existirían células precursoras en ese tejido adulto que participan en la adipogénesis y son células cultivables. Sin embargo, el trabajo de Zuk et al. (2001) describe por primera vez el TA como fuente de CMM. La búsqueda de otras fuentes de CMM surge debido a que se deseaba encontrar alternativas a la fuente de MO, en el caso del TA tiene varias ventajas: fuente con gran cantidad de células (Strem et al. 2005; Rebelatto et al. 2008; Takemitsu et al. 2012), su extracción presenta menor discomfor (Yoo et al. 2009; Locke et al. 2011), mayor capacidad proliferativa y estabilidad de plasticidad a altos pasajes (Zuk et al. 2001; Covas, 2007; Pendleton et al. 2013).

Según la *International Society of Cellular Therapy* (ISCT), para animales domésticos se pondera la tridiferenciación *in vitro* en linaje adiposo, cartilagosos y óseo para poder ser denominado de CMM (Bourin et al. 2013; Dominici et al. 2006; Horwitz et al. 2005). En cuanto a CMM caninas la literatura internacional está retrasada respecto a los avances en humana y animales de experimentación. Esta descrito por primera vez CMM-MO caninas por Kadiyala et al. (1997) pero solo comprueba la diferenciación del linaje osteogénico, no realizando una caracterización completa. Posteriormente, Ock et al. (2013) consigue la

tridiferenciación *in vitro*. A pesar de que existen varios trabajos anteriores que utilizan la nomenclatura CMM-MO (Arinze et al. 2003; Jung et al. 2008; Ryu et al. 2012) pero sin conformar la caracterización sugerida. Las CMM-TA con una caracterización completa son descritas por primera vez por Vieira et al. (2010).

## 1.2 Características de las células madre mesenquimales (CMM)

Existieron grandes interrogantes en la comunidad científica, centrado en estas dos preguntas: ¿Qué son las CMM? y ¿Qué criterios adoptar para denominarlas de CMM? Existen una infinidad de trabajos publicados que denominan CMM sin realizar una caracterización adecuada. A causa de esta situación, en los trabajos de la ISCT se dictan una serie de sugerencias para que toda la comunidad científica utilice los mismos criterios cuando se refieren a CMM, con el fin de estandarizar y poder repetir diversos trabajos que utilizan las CMM con fines terapéuticos). Para denominar unas células de CMM deben ser adherentes al plástico, poseer morfología fibroblástica, presentar determinados marcadores de superficie e *in vitro* poseer la capacidad de diferenciarse en células de linaje adiposo, cartilaginoso y óseo (Horwitz et al. 2005; Dominici et al. 2006). Estas sugerencias serán abordadas con mayor detalle a continuación.

### 1.2.1 Nomenclatura de las CMM

Las CMM-MO se conocen en la literatura internacional como MSC (*mesenchymal stem cells*), este término fue popularizado por el trabajo de Caplan y col. (1991) y alineado con las sugerencias de la ISCT. Pero también se han denominado de células CFU-F (*colony forming units-fibroblastic*) (Friedenstein et al. 1970), MSC también es sinónimo de *Multipotent mesenchymal stromal cells* (Horwitz et al. 2005) o *mesenchymal stem/stromal cells* (Letouzey et al. 2015). Las CMM-TA actualmente se conocen internacionalmente como ADSC/ASC (*adipose-derived stem cells*) (Baglioni et al. 2012; Bourin et al. 2013). Pero también han sido denominadas de AT-MS/A-MS (*adipose-tissue mesenchymal stem cells*) (Martinello et al. 2011), ADAS (*adipose-derived adult stem cells*) (Wrage et al. 2008), MADS (*multipotent adipose-derived stem cells*) (Quattrocchi et al. 2010) o PLA (*processed lipoaspirate cells*) (Zuk et al. 2001). Los trabajos pertenecientes a la ISCT han ayudado a clarificar que tipo nomenclatura usar y de esta manera uniformizar el lenguaje científico sobre las CMM.

### 1.2.2 Fuentes de extracción de las CMM

Las CMM pueden ser extraídas de en individuos adultos de la MO (A. Friedenstein et al. 1970), TA (Zuk et al. 2001), sangre periférica (Zvaifler et al. 2000; Campagnoli et al. 2001), piel (Toma et al. 2001), musculo, cerebro (Jiang et al. 2002), hígado (Campagnoli et al. 2001), pulpa dentaria (Seo et al. 2004; Chen et al. 2006; Gay et al. 2007) y páncreas (Seeberger et al. 2011). Por otro lado, pueden ser extraídas de anexos embrionarios como la matriz del cordón umbilical (CU) (Mitchell et al. 2003; Weiss and Troyer 2006), sangre de CU, placenta (Kögler et al. 2004; Rebelatto et al. 2008) y líquido amniótico (Prusa et al. 2003).

### 1.2.3 Características *in vitro* de las CMM

#### Marcadores antigénicos de superficie

Las CMM presentan marcadores inmunofenotípicos recomendados por ISTC para humanos, fueron escogidos para diferenciar las CMM de otros tipos celulares. Principalmente, presentan las CMM-MO: CD105+, CD73+ CD90+ y falta de expresión de CD45-, CD34-, CD14-, CD11b-, CD19- y HLA-DR- (Dominici et al. 2006); para las CMM-TA: CD90+, CD73+, CD105+ y CD44+, marcadores negativos CD45- CD31- (Bourin et al. 2013). Sin embargo, la presencia de los marcadores mencionados no son exclusivos de CMM, sino que otras células adultas los poseen. Por lo que existen otras características que deben ser comprobadas para poder denominar a estas células estromales en CMM, que serán comentados más adelante. Los marcadores mencionados anteriormente son escogidos para humanos, estos mismos son utilizados para especies como canina y equina, no siendo diseñados específicamente para ellos. Además, existe dificultad en obtener anticuerpos específicos, lo que lleva en la actualidad a cuestionar cuales serían los marcadores de superficie adecuados para utilizar en caninos y equinos (Taylor et al. 2007; de Mattos Carvalho et al. 2009; Requicha et al. 2012; Screven et al. 2014).

#### Diferenciación *in vitro*

Debido a las dificultades en la correcta inmunofenotipificación de las células pertenecientes a especies domésticas, es que tiene un peso mayor en la caracterización la tridiferenciación *in vitro*, considerada como criterio de referencia (del inglés, *gold standard test*) para poder denominarlas de CMM, basado en las sugerencias de la ISCT. La característica fundamental de las CMM en cultivo es su plasticidad de diferenciación en células del linaje adiposo, cartilaginoso y óseo (Dominici et al. 2006; Covas, 2007). La diferenciación adipogénica ocurre cuando existe en el medio la presencia de isobutilmetilxantina e insulina. En estas condiciones ocurre la activación de la maquinaria celular para la síntesis de ácidos grasos y adquieren rápidamente acúmulos de lípidos en el citoplasma. La diferenciación condrogénica se da cuando son cultivadas en presencia de factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*)) e insulina, ellas adquieren una morfología fibroblastoide y pasan a secretar glicosaminoglicanos, proteínas oligoméricas de matriz cartilaginosa, decorina, colágeno tipo II y condroaderina, los cuales son componentes normales del tejido cartilaginoso. La diferenciación osteogénica, ocurre en presencia de inductores como betaglicerofosfato, ácido ascórbico y dexametasona. En presencia de estas sustancias las CMM adquieren morfología osteoblástica y pasan a expresar fosfatasa alcalina y depositar matriz extracelular rica en calcio (Covas, 2007). Las CMM además de la clásica capacidad de tridiferenciación *in vitro*, presentan plasticidad para otros linajes como: cardiomiocito (Makino et al. 1999; Toma et al. 2002; Tomita et al. 2007), linajes no mesodérmicos como hepatocitos (An et al. 2014; Kadota et al. 2014) y células tipo neuronales (Kamishina et al. 2006; Scuteri et al. 2011).

#### Inmunomodulación

Las CMM presentan una superficie antigénica que interaccionan con los linfocitos T. Entre esas moléculas podemos destacar: MHCI, CD90 (Thy-1), VCAM-vascular cell adhesion molecule, ICAM-intercellular adhesion molecule, CD166 y diferentes integrinas. Por otro lado, no expresan moléculas coestimuladoras como: CD80, CD86 y MHCII en condiciones basales (Covas, 2007). Con este fenotipo es de



esperar que las CMM estimulen la proliferación de los linfocitos T, por lo tanto, sean rechazadas por el receptor en caso de células alogénicas o xenogénicas. Sin embargo, diversos experimentos demuestran que no estimula la proliferación de linfocitos T, sino que la inhibe (Rasmusson et al. 2005). En esta característica de poder modular la respuesta inmune se han centrado varias investigaciones con el propósito de crear un banco de CMM criopreservadas y no tener problemas de rechazo al ser usadas terapéuticamente (Jung et al. 2009; Martinello et al. 2011). Se ha descrito que las CMM *in vitro* son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T y células de la inmunidad innata. Esto es debido a la liberación de varias moléculas secretadas, de las cuales podemos destacar indolamina 2,3 dioxigenasa, (IDO-*indoleamine 2,3-dioxygenase*), antígeno leucocitario humano tipo G (HLA-g-*human leukocyte antigen type g*) IL 10 (interleuquina 10) y TGF- $\beta$  (Jones & McTaggart, 2008). También las CMM son capaces de inducir la activación alternativa de macrófagos (M2), los cuales poseen un efecto sinérgico sobre el poder inmunosupresor (Anderson et al. 2012). Sin embargo, actualmente no está totalmente dilucidado el mecanismo de inmunomodulación que poseen las CMM, pero si se ha descrito *in vivo* e *in vitro* su capacidad de inhibir la alo o xenorespuesta (Niemeyer et al. 2010; Rasmusson et al. 2005; Yaneselli et al. 2013).

#### Angiogénesis

Las CMM tiene la habilidad de alta autorrenovación y moderada plasticidad, jugando un papel clave en la renovación/regeneración de tejidos posterior a una injuria (Asahara et al. 1997; Ko et al. 2011; Liew & O'Brien, 2012). El principal mecanismo para promover la angiogénesis es a través de la liberación de moléculas bioactivas con efecto local, que estimulan la neovascularización. La mayoría de los trabajos sobre infartos de miocardio y sobre lesiones crónicas de piel por problemas de isquemia estudian esta característica *in vivo* para promover la neovascularización y así mejorar la regeneración (Imanishi et al. 2008; Bronckaers et al. 2014). De las moléculas que secretan las CMM se destacan: VEGF-*vascular endothelial growth factor*, FGF-2-*fibroblast growth factor*, Ang-1-*angiopoietin-1*, MCP-1-*monocyte chemoattractant protein-1*, IL6 y PLGF-*placental growth factor* (Kinnaird et al. 2004a; Hung et al. 2007; Wu et al. 2007; Chen et al. 2008; Boomsma & Geenen, 2012). La interacción de las CMM con las células endoteliales modula las etapas de la revascularización, interviniendo en las etapas de supervivencia/proliferación (Rehman et al. 2004; Bronckaers et al. 2013), migración (Choi et al. 2013; Kim et al. 2013c) y maduración (Potapova et al. 2007; Kachgal & Putnam 2011). Esta interacción se ha demostrado *in vitro* (Kinnaird et al. 2004a; Duffy et al. 2009; Boomsma & Geenen 2012) e *in vivo* (Laschke et al. 2006; Wu et al. 2007; Lee et al. 2009a) confirmando que las CMM tiene un rol crucial en la regeneración de tejidos.

#### Migración al foco inflamatorio (*homing*)

Las CMM exhiben un gran tropismo por tejidos lesionados denominado de "homing" y rápidamente promueven la regeneración (Weiss & Troyer, 2006). La migración de CMM se ha descrito en lesiones inducidas (Chen et al. 2001; Zhao et al. 2002; Chen et al. 2003), a nivel de sistema nervioso central (Azizi et al. 1998; Hofstetter et al. 2002), infarto de miocardio (Shake et al. 2002). El *homing* se ha descrito *in vivo* en modelo murino cuando son inyectadas CMM, las células llegan al sitio de lesión (Jackson et al. 2012) pero se vio que la sobrevida en el microambiente inflamatorio es por corto período de tiempo (Skardal et al. 2012). Las CMM son atraídas por factores quimiotácticos de lesión o también por formación de tumores. En el foco inflamatorio se liberan factores que atraen a las

CMM como: SDF1-*stromal cell-derived factor-1* (Abbott et al. 2004), PDGF-*platelet-derived growth factor*, IGF-1-*insuline-like growth factor 1*, IL8 y TNF $\alpha$ -*tumor necrosis factor alpha* (Khosrotehrani, 2013; Nakamizo et al. 2005). En el caso de los tumores generalmente atraen células estromales simulando un proceso de regeneración/cicatrización y estos factores son quimiotácticos para las CMM (Tlsty & Hein, 2001; van Kempen et al. 2003).

#### Efecto antimicrobiano

Las CMM son capaces de reconocer patógenos a través de receptores *Toll-like receptor* (TLR) ( Pevsner-Fischer et al. 2007; Liotta et al. 2008; Tomchuck et al. 2008; Opitz et al. 2009) y desarrollar una actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana tiene dos vías descritas, una directa con la secreción de catelicidina (LL-37) que tiene un efecto de destrucción directa del microbio o un efecto quimiotáctico para células del sistema inmune innato (Lande et al. 2007; Nijnik and Hancock 2009; Krasnodembskaya et al. 2010). La otra vía es la indirecta con la secreción de factores inmunomoduladores, los cuales, aumentan la actividad fagocítica de las células del sistema inmune (Mei et al. 2010). En casos extremos de sepsis en modelo murino se ha observado una reducción en los recuentos bacterianos y una reducción en el proceso inflamatorio al aplicar CMM vía sistémica (Gonzalez-Rey et al. 2009; Németh et al. 2009). En estudios de casos caninos con defectos óseos asociados a osteomielitis tratados con CMM-TA, se describe una significativa reducción del proceso inflamatorio y cese de secreciones purulentas (fistulas) a pesar de la no respuesta a la antibióticoterapia previa a la terapia celular (Yaneselli et al. 2013; Yaneselli et al. 2014). Esta respuesta favorable en casos clínicos se atribuye a que las CMM poseen poder de inmunomodulación y antimicrobiano.

#### Senescencia y telómeros

El envejecimiento de los individuos es un proceso complejo, que está fuertemente vinculado al desgaste de las células, el acúmulo del desgaste oxidativo celular y la pérdida de la capacidad de regenerar tejidos. Una razón del envejecimiento es que las CMM comienzan a perder sus características de CM. Los linajes de CMM cultivadas *in vitro* también envejecen pasando por un número limitado de divisiones y después dejan de dividirse entrando en un estado de senescencia (Zago, 2007). Existen dos tipos de senescencia: Senescencia telomerasa-independiente: puede ser inducida por una agresión o situación de estrés que induce la expresión de genes de estrés u oncogenes, que desencadenan una señalización celular que desemboca en la imposibilidad de la célula en llegar a la fase S, inhibiendo el ciclo celular. Senescencia telomerasa-dependiente: cada vez que el ADN de un cromosoma es duplicado para que ocurra una división celular, pierde un pequeño fragmento de la sección terminal denominada telómero. Los telómeros contienen regiones con secuencias altamente repetidas de TTAGGG hasta 10.000 veces. Cuanto más veces se divida una célula, más corto serán los telómeros en sus cromosomas hasta llegar al punto que estos sean muy cortos e impidan la división celular. Porque el ADN no puede ser duplicado debido a que la ADN polimerasa no consigue duplicar correctamente las extremidades de la molécula de ADN. La reconstitución de esta porción terminal es indispensable para que los linajes celulares continúen con su capacidad de duplicación, esta función es hecha por la enzima denominada telomerasa (Covas, 2007; Zago, 2007). Se ha visto en las CMM-TA existe una reducción drástica de la telomerasa entre P<sub>2</sub>-P<sub>8</sub> (Martinello et al. 2011) pierden la actividad de esta enzima y aumentando progresivamente la cantidad de células que entran en senescencia. Otras investigaciones muestran un crecimiento drástico de las

células que entran en senescencia entre los P<sub>10</sub>-P<sub>15</sub> para CMM-TA humanas (Zuk et al. 2001).

### 1.3 Perspectivas del uso terapéutico de las CMM

El uso terapéutico de las CMM despertó mucho interés y amplió el campo de la medicina regenerativa. Las CMM presentan cinco características atractivas: 1) multipotencialidad; 2) inmunomodulación; 3) angiogénica; 4) migran al foco inflamatorio (*homing*) y 5) antimicrobiana. Por esta razón ha tenido un crecimiento exponencial sus publicaciones científicas. Utilizando como promotor de búsqueda “*mesenchymal stem cell therapy*” encontramos que en el año 2000 sólo existían 52 publicaciones y en cambio en el año 2014 se observa un exponencial ascenso a 1.995 publicaciones, indicando que la comunidad científica presenta gran interés y perspectiva por el uso terapéutico de las CMM (PubMed, 2015).

#### 1.3.1 Principales usos terapéuticos en animales domésticos como modelo animal y/o paciente veterinario.

Cuando nos referimos a animales domésticos engloba animales de compañía (canino, felino y equino) y animales de granja (bovinos, caprinos, ovinos y suinos). Existen homologías de patologías genéticas humanas en 292 caninas, 163 felinas, 142 bovinas y en 109 equinas (OMIA, 2015). Estas homologías se dan en animales que desarrollan patologías genéticas en condiciones naturales, influenciadas por el ambiente y larga expectativa de vida (Volk et al. 2012; Volk & Theoret, 2013). Los modelos de roedores no poseen estas interacciones naturales con el ambiente, baja expectativa de vida y la alta homocigocis debido que son linajes diseñados con en uno o más genes defectuosos. También los equinos destinados a actividad deportivas proporcionan un interesante modelo comparable a los atletas humanos (de Mattos Carvalho et al. 2011). La contribución de los animales domésticos como modelo experimental trasladado a humanos ha sido muy exitosa. Uno de los ejemplos más claros es que cinco décadas atrás el modelo canino contribuyó al refinamiento de las terapias hematológicas. En la década de los sesentas se comienza con la utilización de modelo canino para el refinamiento de la técnica de trasplante de CMH y estudios para disminuir la enfermedad injerto contra huésped (Thomas & Storb 1999; Suter 2011).

Existen antecedentes de modelos experimentales con animales domésticos y de laboratorio de diferentes patologías. A continuación vamos a mencionar principales usos de CMM con fines terapéuticos.

#### Aparato musculoesquelético

Las lesiones tendinosas en equinos deportivos son frecuentes, en especial la afección del tendón flexor digital superficial. La cicatrización normal no consigue regenerar el tendón y la cicatriz disminuyen la resistencia y elasticidad original, lo que se traduce en mayor proporción de recidivas y menor retorno a las actividades deportivas (Woo et al. 1999; Dowling et al. 2000; Balesdent Barreira et al. 2008). En cambio, se ha descrito que la aplicación de CMM sobre lesiones tendinosas promueve una mejor calidad de la regeneración, un tipo y orientación adecuado de fibras colágenas para darle una similar resistencia y elasticidad del tendón original (Nixon et al. 2008; de Mattos Carvalho et al. 2011). Este efecto beneficiosos de las

CMM aumenta la frecuencia de recuperación de los equinos a las actividades hípcodeportivas y disminuye las recidivas (Pacini et al. 2007).

En caninos los defectos óseos en huesos largos generalmente tienen una adecuada resolución, pero en inapropiadas condiciones como estabilidad inadecuada de la fractura, mala reducción o aposición de la fractura, inadecuada irrigación, infección o fragmento óseo faltante no se consigue consolidar el defecto óseo (Millis & Jackson, 2006; Schulz, 2009). Existe reportes de caso clínicos caninos en los cuales se aplicaron CMM en la zona de lesión y existió una adecuada resolución de la fractura, retorno de los procesos osteogénicos (Semiglia et al. 2014), también en no uniones asociadas a osteomielitis se observó una recuperación, con un retorno de la osteogénesis, reabsorción de los secuestros, consolidación de la no unión y retorno funcional de miembro afectado (Yaneselli et al. 2013; Yaneselli et al. 2014). En caninos con defectos óseos inducidos, se observó que la aplicación de CMM asociadas a injerto óseo promueven la regeneración y consolidación del defecto (Bruder et al. 1998; Arinzeh et al. 2003).

La aplicación de CMM para patologías articulares está descrita para la osteoartritis. La osteoartritis es una patología en la que existe una degeneración de las estructuras de la articulación y un microambiente inflamatorio nocivo para la regeneración de la matriz cartilaginosa, esta patología es crónica y progresiva pudiendo culminar con la pérdida de la función o anquilosis de la articulación (Buckwalter and Mankin 1997). La aplicación de CMM intraarticular promueve la regeneración de matriz cartilaginosa y disminuye la progresión de la osteoartritis debido a su poder inmunosupresor y plasticidad de diferenciación (Walsh et al. 1999; Murphy et al. 2003; McIlwraith et al. 2011).

#### Cardíacas

Principalmente se ha descrito varios trabajos sobre infartos cardíacos, lo que causa una isquemia y muerte del miocardio. Las CMM tienen propiedades de inmunomodulación, angiogénesis y liberar factores de crecimiento cardiogénicos (Bartunek et al. 2007; Imanishi et al. 2008). Estas características transforman a las CMM en una atractiva opción terapéutica para las cardiopatías. Varios trabajos describen la aplicación de CMM en infartos cardíacos inducidos y se observa una neovascularización y disminución de la reacción inflamatoria, lo que se traduce en una mejora funcional del miocardio (Kinnaird et al. 2004b; Perin et al. 2008).

#### Cutáneas

La aplicación de CMM en lesiones cutáneas promueve la neovascularización y reepitelización en la zona afectada. Estos efectos beneficiosos las convierten en una opción terapéutica prometedora para pérdidas de grandes extensiones de piel o quemaduras (Agay et al. 2010; Azari et al. 2011). En lesiones cutáneas inducidas en caninos se ha visto buenos resultados cuando son aplicadas CMM, mejorando la contracción de la herida y posterior regeneración de la piel (Kim et al. 2013b). También se ha descrito que las CMM protegen del rechazo a los injertos de piel de los efectos deletéreos de la isquemia al ser injertados en el huésped (Lowry et al. 2008; Vidor, 2015).

#### Neurológicas

Las patologías neurológicas son afecciones graves e irreversibles en muchos casos, debido a que el tejido nervioso posee una escasa regeneración, Entonces, cuando

existe daño a nivel de cerebro y/o médula espinal se presenta pérdida sensorial y motora irreversible. En modelo murino varias investigaciones han descrito una reducción del déficit funcional cuando son aplicadas CMM en afecciones del sistema nervioso central (Chen et al. 2001a; Chen et al. 2001b; Ohta et al. 2004; Honma et al. 2006). Además en caninos también se ha descrito un efecto beneficioso de las CMM sobre lesión inducidas de médula espinal, la aplicación de células a nivel intratecal en la zona lesionada muestra un mejoramiento de los animales tratados con retorno funcional y sensorial parcial, lo cual es un gran avance, ya que los tratamientos tradicionales no consiguen estas mejorías (Lim et al. 2007; Jung et al. 2009; Nishida et al. 2012). En un caso clínico humano se describe una similar mejoría (Kang et al. 2005). El efecto beneficioso de las CMM sobre lesiones neuronales se atribuye a su efecto neuroprotector e inmunosupresor, lo que genera un microambiente adecuado para la regeneración neuronal en la zona de lesión (Belmadani et al. 2005; Oh et al. 2008).

#### Urológicas

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) es una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales. Se han desarrollado alternativas terapéuticas para esta patología irreversible como la utilización de CMM. Uno de los inconvenientes es que los reportes con una buena respuesta a la terapia celular para IRC es sobre modelo murino (Cavaglieri et al. 2009; Lee et al. 2010; Villanueva et al. 2013), los cuales describen una disminución en el daño y aumento de la funcionalidad. Sin embargo, en felinos con IRC de forma natural, no se ha podido comprobar efectos beneficiosos de la terapia celular. Entonces, aún está en fase de experimentación el ajuste de la vía de administración y fuente de CMM más conveniente (Quimby et al. 2011; Quimby & Dow, 2015).

Además esta descrito exitosamente el uso CMM para otras patologías: enfermedad de Crohn's (Cho et al. 2015; Ciccocioppo et al. 2015), enfermedad inflamatoria intestinal (Anderson et al. 2012; da Costa Gonçalves et al. 2014), enfermedad injerto contra huésped (Amorin et al. 2014; Le Blanc et al. 2008), infertilidad (Abd-Allah et al. 2013; Terraciano et al. 2014) y sepsis (Anderson et al. 2012; Magrisso, 2014).

Esta sumatoria de evidencias científicas ha demostrado el enorme potencial que poseen las CMM con fines terapéuticos para pacientes veterinarios y/o humanos. Además los animales domésticos poseen patologías similares a humanos brindando un excelente modelo para desarrollar nuevas terapias y conseguir grandes avances en medicina regenerativa humana y de otras especies (Volk & Theoret, 2013).

#### 1.3.2 Iniciativa de “Una Salud” (*One Health*)

Actualmente, el desarrollo de nuevas terapias en medicina regenerativa presentan gran importancia los modelos con animales domésticos, debido a que en veterinaria se posee menos restricciones legales y éticas para su experimentación comparada con los humanos. Esta situación favorece la investigación sobre animales domésticos en medicina regenerativa y el traslado a medicina humana. También permite avanzar en el conocimiento de CME e iPS las cuales presenta grandes dificultades éticas y riesgos en su aplicación. Entonces, es importante la iniciativa de “Una Salud” (*One Health*) con un pensamiento amplio de que las ciencias médicas y veterinarias convergen en el salvaguardar de la salud, y la interconexión de las investigaciones médicas y veterinarias podrían tener un efecto sinérgica

favoreciendo el avance del conocimiento de la patogénesis de diversas afecciones, además de contribuir al desarrollo de nuevas terapias en el campo de la medicina regenerativa. Fortaleciendo el conocimiento colectivo interdisciplinario de la salud. Ya ha sido promovida esta interconexión por diferentes instituciones (Kahn et al. 2008; Nobert, 2011; Volk & Theoret, 2013; One Health initiative, 2015).

## 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 2.1 Estructura del TA

Inicialmente la fuente de CMM más estudiada fue la MO, pero en la actualidad existe gran interés por el estudio del TA como fuente de CMM, descritas por primera vez por Zuk et al. (2001). Las CMM-TA son extraídas de la fracción vascular estromal (FVE) (del inglés, *stromal vascular fraction*) mediante digestión enzimática del TA. Esta fuente tiene ciertas ventajas sobre las de MO: mayor cantidad de CMM y elevada capacidad de proliferación (Zuk et al. 2002; Strem et al. 2005 Kern et al. 2006; Baglioni et al. 2012), el método de extracción causa menos discomfort (menos invasivo) (Strem et al. 2005; Kern et al. 2006) y perdura su estado de indiferenciación por un número mayor de pasajes (Zuk et al. 2001; Strem et al. 2005; Rebelatto et al. 2008; da Silva Meirelles et al. 2009; Takemitsu et al. 2012). Estas características motivaron la intensificación de los estudios de las CMM-TA como fuente segura y conveniente para el uso en medicina regenerativa (Richardson et al. 2007; Gangji et al. 2011; Martinello et al. 2011; Baglioni et al. 2012; Zhao et al. 2012).

Para comprender más sobre las CMM-TA es necesario profundizar sobre el tejido donde son extraídas. El conocimiento sobre el TA se ha ido desarrollando paulatinamente, inicialmente se conocía solo la función de reservorio energético y aislante térmico. Posteriormente se describe su importante rol en la regulación metabólica con su participación en el sistema endocrino (Trayhurn & Beattie, 2001; Fonseca-Alaniz et al. 2007). Actualmente, se sabe que el TA es un reservorio de CMM, revolucionando nuevamente el conocimiento sobre este tejido (Zuk et al. 2001; Baglioni et al. 2009; Vieira et al. 2010).

El TA se puede diferenciar en dos tipos amarillo o blanco que representa la mayoría de tejido en adultos, también denominado TA unilocular porque la célula contiene una única gota grande de lípido. El otro es el tejido marrón que es escaso en adultos y es denominado TA multilocular. La adipogénesis es un tema que está abierto a debate, pero se piensa que las CMM o progenitoras dan origen a células unipotentes denominadas adipoblastos. El TA unilocular se comienza a formar a partir de las primeras semanas de vida fetal, a partir de las CMM que rodean pequeñas vénulas se comienzan a diferenciar en adipoblastos. Estas CMM no se pueden diferenciar directo a un adipocito unipotente por su morfología fibroblástica pero ya comprometieron su diferenciación a adipocito. Estos preadipocitos comienzan acumulando triacilgliceroles en vesículas y presentan marcadores tempranos de especialización como es la enzima lipoproteinasas. Estos preadipocitos se transforman en adipocitos inmaduros porque presentan toda la maquinaria necesaria para sintetizar y degradar triacilgliceroles. Los adipocitos inmaduros acumulan gotas de lípidos progresivamente, por lo que el núcleo cada vez adopta una posición más

excéntrica. Finalmente se llega a la etapa de adipocito maduro formando la gran gota lipídica y no poseen más la capacidad de dividirse por mitosis (Bruehl et al. 2014).

## 2.2 Fuentes de CMM-TA y sus características

Los estudios sobre la caracterización de CMM caninas son escasos y relativamente recientes. Para caracterizar las CMM-TA caninas han sido utilizados diferentes marcadores para detectar los antígenos de superficie, principalmente CD29, CD44 y CD90 (Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Takemitsu et al. 2012; Screven et al. 2014). Pero existe el problema que los marcadores humanos se han adoptados como referencia para caninos, a pesar de no ser específicos para la especie (Dominici et al. 2006; Rebelatto et al. 2008). El CD29 es una molécula involucrada en adhesión celular, el CD44 es una glicoproteína involucrada en adhesión celular y migración de las CMM y el CD90 (Thy-1) es una proteína de superficie utilizada como marcador para diferentes tipos de CM. Además, se deben utilizar otros marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45, los cuales deben estar ausentes o presentar baja expresión en las CMM (Dominici et al. 2006; Bourin et al. 2013; Screven et al. 2014). Es importante destacar que al utilizar marcadores positivos y negativos adoptados de las células humanas, ello genera gran controversia en la literatura de cuáles son los adecuados marcadores para caracterizar específicamente las CMM caninas, sumado a que existe escasa disponibilidad de anticuerpos específicos para esta especie (Vieira et al. 2010; Requicha et al. 2012; Takemitsu et al. 2012; Screven et al. 2014). Recientemente, fue adicionado a la caracterización de CMM caninas la detección de un grupo de genes denominados *Stemness markers*, los cuales incluye Oct3/4; Sox2 y Nanog vinculados a la capacidad de autorrenovación y multipotencialidad (Takemitsu et al. 2012; Guercio et al. 2013).

Actualmente existe gran interés por comparar las CMM-TA provenientes de diferentes regiones anatómicas. En diversos trabajos en humanos, e incluso en modelos animales han sido comparados algunos aspectos de las CMM-TA provenientes de fuente subcutánea (SC) y visceral (VS) (Peptan et al. 2006; Baglioni et al. 2009; Baglioni et al. 2012; Requicha et al. 2012). Los resultados de diversos trabajos demuestran que las CMM-TA SC presentan mayor capacidad de proliferación celular comparado con la fuente VS en humanos (Baglioni et al. 2009), canino (Guercio et al. 2013) y lepóridos (Peptan, Hong, and Mao 2006). Sin embargo, cuando es evaluada su multipotencialidad existen divergencias entre los autores sobre cual fuente presenta mayores ventajas (Peptan et al. 2006; Baglioni et al. 2009; Martínez-Lorenzo et al. 2009; Requicha et al. 2012).

Existen escasos estudios en caninos que exploren la habilidad proliferativa, inmunofenotipificación, plasticidad *in vitro* y las comparen entre diferentes fuentes de CMM-TA. Requicha et al. (2012) evaluaron las fuentes de CMM-TA SC y VS (región del omento), en sus resultados hallaron que son similares las células provenientes de ambas fuentes. En el P<sub>4</sub> las CMM-TA caninas disminuyen significativamente sus marcadores CD73, CD90 e CD105, consideraron que las células en altos pasajes >P<sub>3</sub> pierden drásticamente sus características de CM. A pesar de este trabajo, existe gran controversia en la literatura porque al disminuir los marcadores de CM en altos pasajes, no es sinónimo que pierdan su multipotencialidad *in vitro*. En el trabajo de Guercio y col. (2013) describe que las CMM-TA caninas presentan plasticidad *in vitro* hasta el P<sub>6</sub>. Seguido de los descripciones en otras especies, describen que las CMM-TA conservan su plasticidad condrogénica inclusive en el P<sub>10</sub> (Martínez-Lorenzo et al. 2009). Estos

antecedentes indican que aún no está esclarecido cual es el efecto pasaje sobre la CMM y podrían existir diferencias entre diferentes especies.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS**

En cuanto al estudio de las diferencias en habilidad de proliferación, inmunofenotipificación y plasticidad *in vitro*, entre las CMM-TA extraídas de las fuentes SC y VS, la literatura científica disponible es escasa. Es de destacar que es posible utilizar CMM alogénicas con fines terapéuticos debido a que no generan rechazo en el huésped receptor, por su potencial de inmunomodulación (Arinzeh et al. 2003; Rasmusson et al. 2005; Yaneselli et al. 2013). Por lo tanto, es factible a través de la tecnología de criopreservación formar un banco de CMM para futuras aplicaciones (Martinello et al. 2011). Sin embargo, no se conoce hasta que pasaje las CMM-TA conservan sus características de CM. Como antecedente se han descrito diferencias entre ambas fuentes en humanos (Baglioni et al. 2009, Baglioni et al. 2012), caninos (Requicha et al. 2012; Guercio et al. 2013) y lepóridos (Peptan et al. 2006) con el inconveniente que han enfocado las evaluaciones principalmente en bajos pasajes.

#### **3.1 Hipótesis**

Existen diferencias entre los linajes SC y VS de las CMM-TA que potencialmente podrían representar una ventaja para su aplicación terapéutica en modelos animales y/o pacientes veterinarios.

#### **3.2 Objetivo general**

Evaluar las diferencias *in vitro* de CMM-TA de SC y VS en relación a su habilidad de proliferación, inmunofenotipificación y multipotencialidad *in vitro*.

#### **3.3 Objetivos específicos**

- 1) Aislamiento y proliferación de CMM-TA SC y VS.
- 2) Evaluación de la habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS en bajos pasajes.
- 3) Evaluación de la superficie antigénica de las CMM-TA SC y VS en diferentes pasajes.
- 4) Evaluación de la capacidad de multipotencialidad *in vitro* de las CMM-TA SC y VS en diferentes pasajes.

### **4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Para cumplir con los objetivos planteados fueron extraídas CMM-TA de SC y VS, las cuales fueron caracterizadas por medio de la evaluación de morfología celular, detección de antígenos de superficie y tridiferenciación *in vitro*. Se evaluó en un grupo de 11 animales la habilidad proliferativa de ambas fuentes en P<sub>0</sub>-P<sub>3</sub>. En otro



grupo de 5 animales se evaluó la influencia de diferentes pasajes (P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>) en la plasticidad *in vitro* y marcadores de superficie.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Animales

Fueron tomadas muestras de TA en caninos hembras saludables en interestro. La extracción de TA fue de dos fuentes: subcutánea (SC) de la región del flanco y visceral (VS) de la región periovárica, de un grupo de 11 animales jóvenes (1-3 años) sometidos a ovariectomía. Estas muestras fueron destinadas para los ensayos de habilidad proliferativa. La metodología de extracción fue autorizada previamente por la Comisión de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA) PI N° 13/12, Uruguay. De otro grupo de 5 animales jóvenes (5-11 meses) fue extraído TA SC y VS con similar metodología, para los ensayos de plasticidad *in vitro* y marcadores de superficie en diferentes pasajes. La extracción fue autorizada por *Comissão de ética no uso de animais do Hospital de Clínicas de porto Alegre* (CEUA/HCPA) número 130510, Brasil.

### 5.2 Aislamiento y expansión de CMM-TA

#### 5.2.1 Extracción de TA

Previo a la cirugía se procedió a realizar un completo examen físico al paciente. Posteriormente se realizó una sedación con 0,01mg/Kg de Acepromacina al 1% y 2,5mg/Kg de Ketamina al 5% vía intramuscular 30 minutos previo de la inducción anestésica. La inducción se realizó con lidocaína al 2% 2mg/Kg, Tiopental al 2% 10mg/Kg intravenoso. Luego se procede a la intubación endotraqueal y el mantenimiento anestésico se realizó con Isoflurano al 2%. La analgesia fue en base a Tramadol al 5% 2mg/Kg y Dipirona al 50% 30mg/kg. El animal se colocó de decúbito lateral izquierdo y se rasuró toda la región del flanco derecho y se embrocó con una solución de yodóforo al 3%. Se realizó una incisión de la piel comenzando 1 cm caudal a la última costilla y un 1 cm ventral a la musculatura paravertebral. Una vez incidida la piel se extrajo la muestra SC. Luego se continuó con divulsión de la musculatura abdominal hasta ingresar a la cavidad, se identificó el pedículo ovárico y se realizó la extracción de TA VS, posteriormente se continuó con la ovariectomía de rutina.

#### 5.2.2 Aislamiento de CMM-TA

Fueron tomadas muestras de 3-5 gramos de TA de ambas fuentes y transportadas bajo refrigeración (4-8 °C) en tubo estéril, procesadas en un tiempo máximo de 24 horas. El TA se cortó en trozos y dispensó en un tubo con solución tampón fosfato salino y lavado dos veces. EL TA es sometido a una digestión enzimática durante 40 minutos a 37 °C en una solución de Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) bajo en glucosa con 0,1 mg/ml de colagenasa tipo I (Invitrogen). Posteriormente fue centrifugado a 700g durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido y sembrado en botellas de cultivo o placas. El medio de crecimiento utilizado fue compuesto por DMEM, 10% suero fetal bovino (SFB) y 2% ATB (penicilina/estreptomicina) (Invitrogen).

### 5.2.3 Cultivo de CMM-TA

Las células fueron sembradas en botellas de cultivo con medio de crecimiento e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Diariamente fue evaluada la morfología y el crecimiento celular, cada 48 horas se cambió el medio de crecimiento. Cuando llegaron al 80-90% de confluencia se realizaba el pasaje del cultivo celular.

### 5.3 Nivel de habilidad proliferativa celular

Fueron sembradas las CMM-TA SC y VS en placas de cultivo celular de 24 hoyos de 2 cm<sup>2</sup>/hoyo (Cellsstar). De cada muestra de TA en el pasaje primario (P<sub>0</sub>) se utilizaron tres concentraciones de siembra 4, 6 y 8 x10<sup>5</sup> células viables/cm<sup>2</sup>. Para pasajes no primarios (P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub>) se sembró a 2 y 4 x10<sup>4</sup> células viables/cm<sup>2</sup>. El recuento de células fue realizado en cámara de Neubauer y se utilizó Trypan Blue 0,1% para determinar viabilidad. Cuando llegan al 80-90% de confluencia, son tripsinadas, cosechadas y contadas. Fue monitoreado el tiempo en que llegan al 80-90% de confluencia y la cantidad de células cosechadas, todos los ensayos fueron hechos por triplicado.

### 5.4 Determinación de los antígenos de superficie celular

Las CMM-TA SC y VS en P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub> fueron inmunofenotipificadas por citometría de flujo. Las células fueron lavadas con la solución *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) compuesta por solución tampón salina sin los cationes Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup>, 0,5 Mm EDTA (*ethylenediaminetetraaceticacid*) y 0,5% SFB, levantadas con el método de espátula y resuspendidas en FACS. Fueron centrifugadas a 400g por 5 minutos, resuspendidas en FACS y se adicionaron 10 µL de los siguientes anticuerpos: anti-CD44 conjugado con aloficocianina (clone IM7, Leinco Technologies Inc., St Louis, MO, USA), anti-CD45 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (CD45RO, clone UCHL1, AcrisAntibodies, San Diego, CA, USA) y 20 µL de anti-CD90 conjugado con ficoeritrina (THY1, clone 5E10, antibodies-online, Atlanta, GA, USA). Posteriormente fueron incubadas por 30 minutos a 4 °C y lavadas con FACS antes de ser analizadas. La adquisición de datos fue a través de FACS Canto II (BD Bioscience) y como mínimo tomando 5000 eventos por muestras. Posteriormente los datos fueron analizados por el software FlowJo (TreeStar, Inc., Ashland, OR, USA).

### 5.5 Tridiferenciación *in vitro*

En P<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub> fueron sembradas 9,4 x10<sup>3</sup> células/hoyo en placas de cultivo celular de 24 hoyos, por duplicado. Después de 24-48 horas de siembra con medio de crecimiento sin ATB comenzaba la inducción de diferenciación *in vitro* con el medio de cultivo apropiado, adaptado de lo descrito por Vieira et al. (2010), mencionado a continuación.

Diferenciación adipogénica: al medio de crecimiento fue adicionado 5 µM isobutilmetilxantina (Sigma), 60 µM indometacina (Sigma), 1 µM dexametasona (Sigma) y 5 µg/ml inulina (Sigma). Las células se mantuvieron 21 días en inducción con cambio de medio cada 3-4 días. Después se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 15 minutos, la presencia de gotas lipídicas se evaluó con

la tinción Oil Red O (Sigma). Diferenciación condrogénica: al medio de crecimiento se le adicionó 50  $\mu\text{M}$  ácido ascórbico (Sigma), 10 ng/ml TGF- $\beta$  (Sigma), 6,25  $\mu\text{g/ml}$  insulina. La inducción fue realizada por 21 días, cambiando el medio cada 3-4 días. Después fueron fijadas y la teñidas con Alcian Blue para detectar la presencia de matriz cartilaginosa. Diferenciación osteogénica: se adicionó 1  $\mu\text{M}$  dexametasona, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma) y 50  $\mu\text{M}$  ácido ascórbico (Sigma). Las células se mantienen 21 días en el medio de diferenciación con cambio cada 3-4 días. Después se fijaron y la presencia de matriz mineralizada se determinó con Alizarin Red S (Sigma).

#### 5.6 Cuantificación de matriz ósea *in vitro*

Para la cuantificación de la matriz ósea fueron utilizados los cultivos celulares inducidos a diferenciación ósea *in vitro* en los P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub> de ambas fuentes. Posteriormente, fueron tomadas 9 imágenes microscópicas de manera aleatoria (dimensiones: 640x480 pixeles, Nikon, TE2000-U) de los cultivos teñidos con Alizarin Red S. El análisis de las imágenes fue realizado a través del software ImageJ, el cual designaba una cantidad de pixeles correlacionado, a la intensidad de la coloración rojiza de la matriz mineralizada.

#### 5.7 Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas de modo descriptivo. Para evaluar la cantidad de células extraídas del TA de cada fuente fue utilizada una prueba no paramétrica de Wilcoxon. La evaluación de la fuente, concentración de siembra y el pasaje como variable explicativa fue utilizada la prueba de Modelos Lineales Generalizados GLM (del inglés, *Generalized Line Models*) utilizando para el análisis el software SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*). Los resultados son expresados en media  $\pm$  desvío estándar y los no paramétricos en mediana (rango intercuartílico Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>). Se consideraron como diferencias significativas los valores con un  $p < 0,05$  y los valores entre  $p > 0,05$  y  $p < 0,10$  como tendencias.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento de las CMM-TA

El recuento de células viables de TA SC y VS (n=11), indicó que existía 3,1 veces mayor cantidad de células viables de la fuente VS comparado con la SC (25,10 (18; 31,71))  $\times 10^6$  vs 8,13 (4,6; 13,75))  $\times 10^6$  células viables/gr de TA,  $p < 0,01$ ) (Figura 1). Las células cultivadas presentaban una morfología fibroblástica y adherencia al plástico (Figura 2).

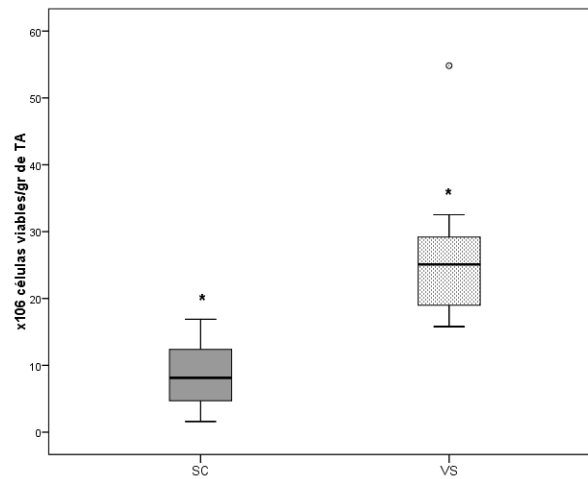


Figura 1. Recuento de células viables del aislamiento de CMM-TA de las fuentes SC y VS (n=11 animal). La fuente VS posee más células que la SC, \*  $p < 0,01$ . Los resultados están expresados con la mediana (Q25; Q75). ° valor atípico (*outlier*).

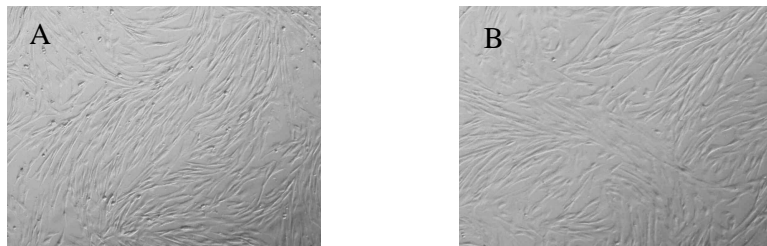


Figura 2. Imagen microscópica de las CMM-TA P<sub>2</sub> (40 X): **A** fuente SC. **B**. fuente VS.

## 6.2 Nivel de habilidad proliferativa celular

Cuando fue realizada la comparación de las fuentes (SC y VS) en P<sub>0</sub> no se observaron diferencias en el tiempo de crecimiento o la cantidad de células cosechadas (Anexo I). Sin embargo, sí existieron diferencias cuando fueron comparadas las concentraciones de siembra de cada fuente sobre el tiempo de crecimiento, la concentración más alta de siembra fue la más rápida en llegar al 80-90% de confluencia celular (Figura 3). Cuando fueron evaluados los pasajes no primarios (P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub>) la fuente influyó sobre el tiempo de crecimiento, las células TA-VS demoraron más tiempo comparado con las provenientes de SC ( $4,86 \pm 0,15$  vs  $3,65 \pm 0,13$  días,  $p < 0,001$ .) (Figura 4, Anexo II). La concentración de siembra influyó sobre el tiempo de crecimiento, la concentración más alta de  $4 \times 10^4$  células viables/cm<sup>2</sup> crecieron más rápido que la menor de  $2 \times 10^4$  ( $4,75 \pm 0,15$  vs  $3,76 \pm 0,11$  días,  $p < 0,001$ ). Además, existió una interacción entre la fuente y el pasaje sobre la cantidad de células cosechadas (Figura 5). La concentración de siembra no primaria influyó sobre la cantidad de células cosechadas únicamente en el P<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ), siendo la concentración más alta inicial, en la que se cosechó una mayor cantidad de CMM-TA.

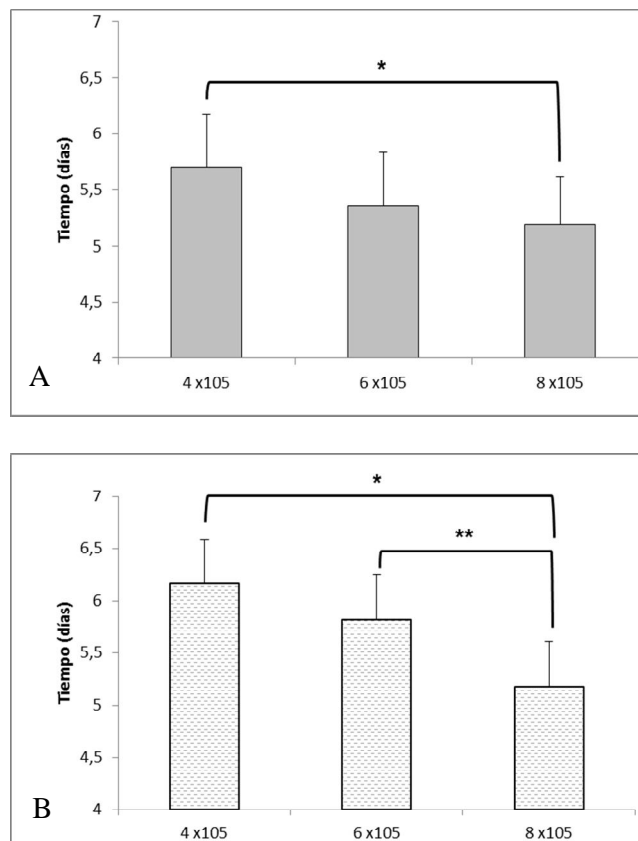


Figura 3. Habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS P<sub>0</sub> (n= 11 animales). Cuando se comparó el tiempo de crecimiento se observó una interacción entre la fuente y concentración de siembra (p<0,05). Se observaron diferencias en cada fuente. **A.** SC (barras grises) \*4x10<sup>5</sup> vs 8x10<sup>5</sup> (p<0,05). **B.** VS (barras con diseño) \*4x10<sup>5</sup> vs 8x10<sup>5</sup> (p<0,01) y \*\*6x10<sup>5</sup> vs 8x10<sup>5</sup> (p<0,01). Los valores están expresados en media ± DE.

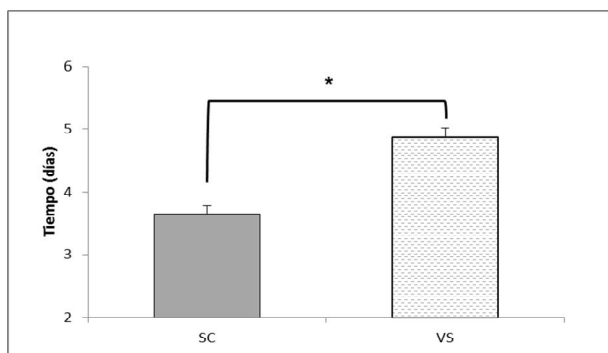


Figura 4. Habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> (n= 11 animales). La fuente VS creció más lento que la SC \*p<0,0001. Los valores están expresados en media ± DE.

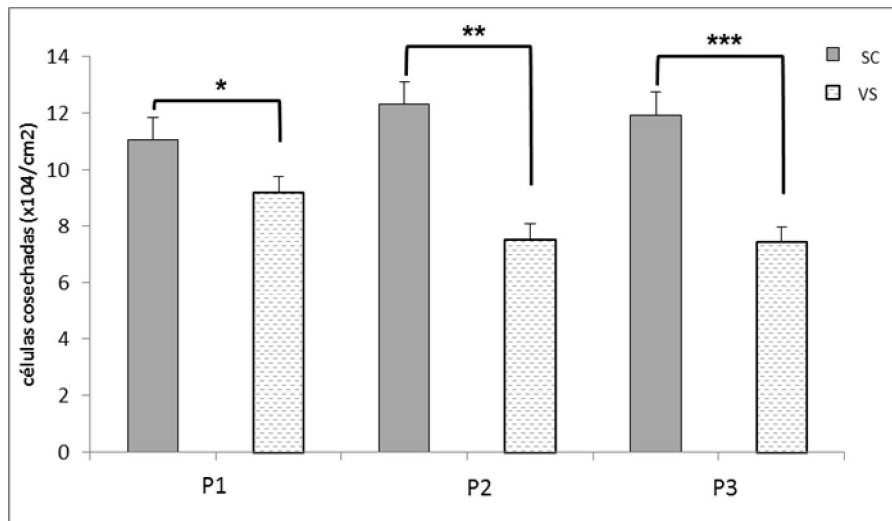


Figura 5. Habilidad proliferativa de las CMM-TA SC y VS (n= 11 animales). Comparación de la cantidad de células cosechadas entre los diferentes pasajes, existió una interacción  $P < 0,05$  entre fuente y pasaje. \*SC vs VS en P<sub>1</sub> ( $p < 0,01$ ), \*\*SC vs VS en P<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*SC vs VS en P<sub>3</sub> ( $p < 0,001$ ). Los valores están expresados en media  $\pm$  DE.

### 6.3 Determinación de los antígenos de superficie celular

La citometría de flujo fue utilizada para inmunofenotipificar las CMM-TA P<sub>3</sub>. Se puede observar que las CMM de ambas fuentes presentaron expresión de los marcadores de células estromales mesenquimales CD44, CD90 y no expresaron el marcador hematopoyético CD45 (Figura 6). Las CMM-TA de ambos orígenes en los P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub> mostraron un similar perfil de expresión que las P<sub>3</sub>. Las CMM-TA presentaron  $>90\%$  del total de las células positivas para CD44 en ambos orígenes. En cambio, existió una menor expresión  $>50\%$  de CD90. En el P<sub>6</sub> el porcentaje de células positivas para CD90 fue más elevado (88-91%). En cambio, el marcador hematopoyético CD45 presentó muy baja expresión  $<5\%$ , salvo en el P<sub>6</sub> que hubo un leve aumento (Cuadro I y Anexo III).

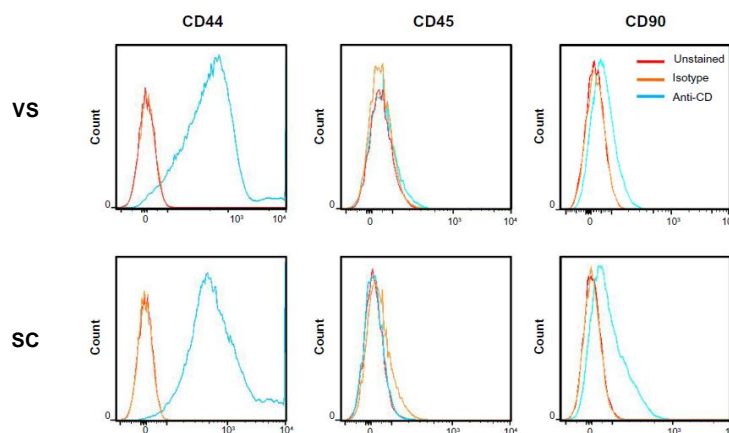


Figura 6. Citometría de flujo: caracterización de las CMM-TA P<sub>3</sub> de origen SC y VS. El histograma plots muestra células sin marcar (línea roja), control de isotipo de anticuerpo (línea naranja). Las células marcadas con anti-CD44 conjugado con APC, anti-CD45 conjugado con FITC y anti-CD 90 conjugado con PE (línea celeste).

Cuadro I. Inmunofenotipificación de las CMM-TA SC y VS P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>

	CMM-TA SC			CMM-TA VS		
	P <sub>4</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>8</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>8</sub>
Marcador de célula estromal mesenquimal						
CD 44	98,8	99,6	98,4	97,8	99,5	95,0
CD 90	58,8	91,9	66,3	68,4	88,5	57,2
Marcador de célula hematopoyética						
CD 45	4,3	11,2	2,6	2,4	7,7	4,2

Resultado expresado en porcentaje de eventos positivos.

#### 6.4 Tridiferenciación *in vitro*

Las CMM-TA SC y VS presentaron la capacidad de tridiferenciarse *in vitro* en los linajes adiposo, cartilaginoso y óseo (Figura 7 y Anexo IV). En la inducción adiposa se comenzó a observar una diferencia morfológica en la primera semana con presencia de vacuolas. Posteriormente, a las 3 semanas fue confirmada la diferenciación, a través de la tinción roja de las gotas lipídicas. Para el linaje cartilaginoso se pudo observar posterior a los 21 días, la coloración azulada que indica la presencia de glicosaminoglicanos característico de la matriz cartilaginosa. En el linaje óseo ya a partir de la primera semana de incubación, se observaron cambios morfológicos y acúmulos celulares, que posterior con la tinción se confirmó la síntesis de matriz mineralizada porque adquirió un color rojo característico. Por otro lado, los controles negativos no presentaron cambios morfológicos, ni tampoco fuerte afinidad por los colorantes, indicando su estado de indiferenciación.

Las células provenientes de SC poseen una mayor proporción de cultivos positivos de diferenciación *in vitro*, cuando son evaluados P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>. Esta diferencia no fue significativa pero existió una tendencia para los tres linaje (adiposo p=0,091, cartilagosos p=0,095 y óseo p=0,091). Además el efecto pasaje afectó negativamente la plasticidad *in vitro*, se observó que pierden progresivamente su potencial de diferenciación (Figura 8). El linaje SC presentó multipotencialidad hasta el P<sub>8</sub>, con una reducción acentuada a partir del P<sub>6</sub>, la mayoría de los cultivos dejaban de crecer (categoría “no creció”) en P<sub>8</sub>. En cambio, el VS presentó potencialidad de tridiferenciación hasta el P<sub>4</sub>.

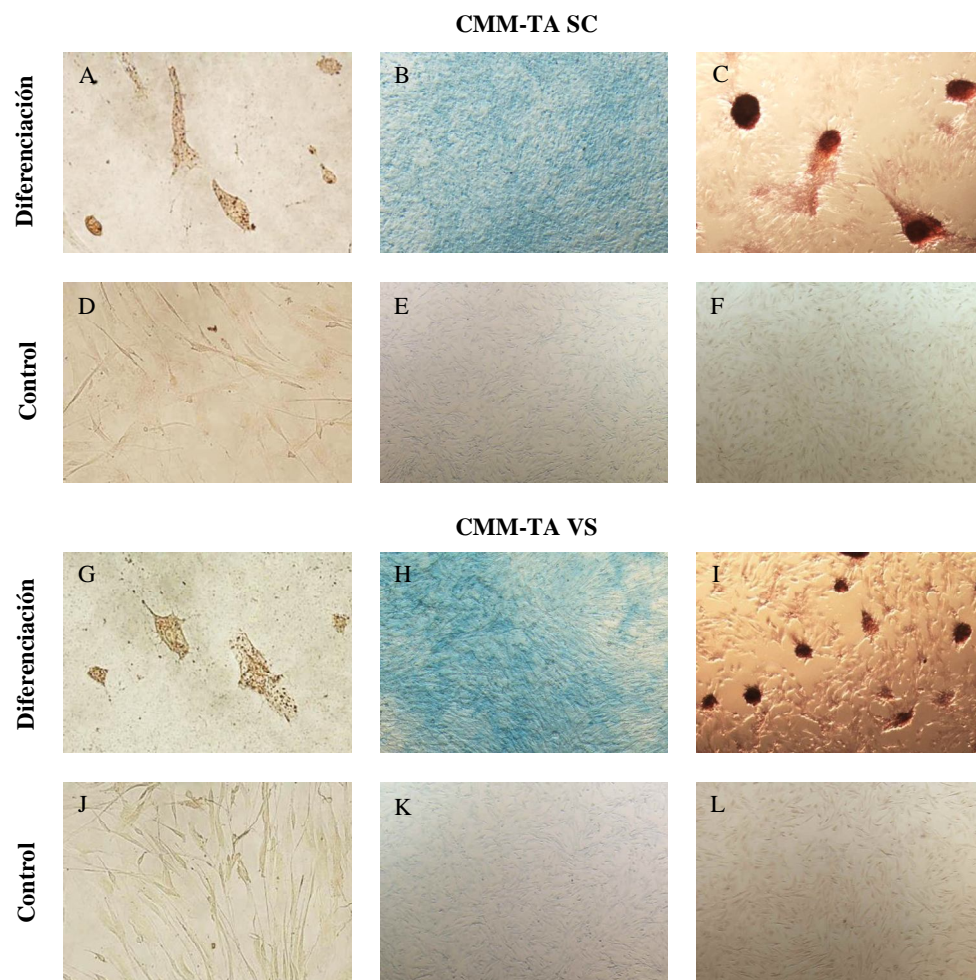


Figura 7. Tridiferenciación *in vitro* de CMM-TA P<sub>2</sub> (n= 4 animales). Imágenes microscópicas: diferenciación adipogénica 400x (presencia de vacuolas lipídicas) para SC y VS (A y G). Diferenciación condrogénica 40x. (B y H). Diferenciación osteogénica 40x (C e I). Los controles negativos corresponden a las imágenes D, E, F (SC) y J, K y L (VS), respectivamente.

### 6.5 Cuantificación de matriz ósea *in vitro*

La capacidad de producir matriz mineralizada fue evaluada a través del análisis de imágenes. Fue comparada la cantidad de matriz de las fuentes SC y VS en el P<sub>4</sub>. La fuente SC fue capaz de producir mayor matriz ósea que la VS ( $10,67 \pm 2,76$  % vs  $7,41 \pm 2,18$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 9). Fue evaluado el efecto de los pasajes P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub> en el linaje SC, se puede observar un decrecimiento progresivo de matriz desde el P<sub>4</sub> hasta P<sub>8</sub> ( $10,67 \pm 2,76$  vs  $7,44 \pm 1,96$  vs  $2,42 \pm 2,73$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 10).



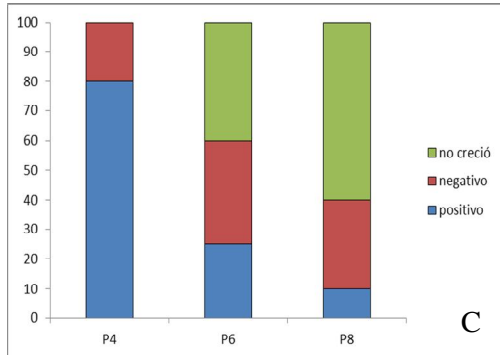
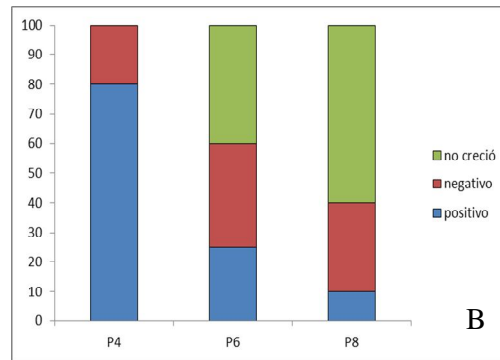
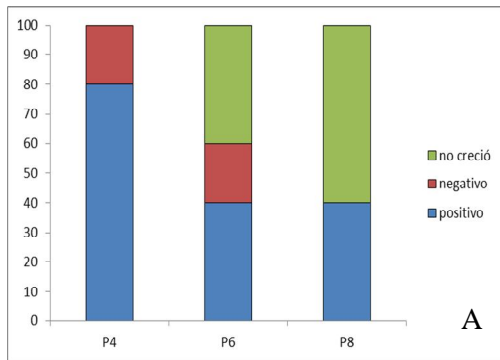


Figura 8. Evaluación del efecto de altos pasajes sobre la proporción de diferenciación *in vitro* de las CMM-TA de ambas fuentes (n=5 animales). **A.** diferenciación adiposa; **B.** diferenciación cartilaginosa; **C.** diferenciación ósea. Se puede observar un aumento progresivo de la categoría “no creció” acentuándose entre P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>. En los linajes adiposo (p<0,001) y cartilaginoso (p<0,01) afecto significativamente su plasticidad. En el linaje óseo existe una tendencia p=0,054.

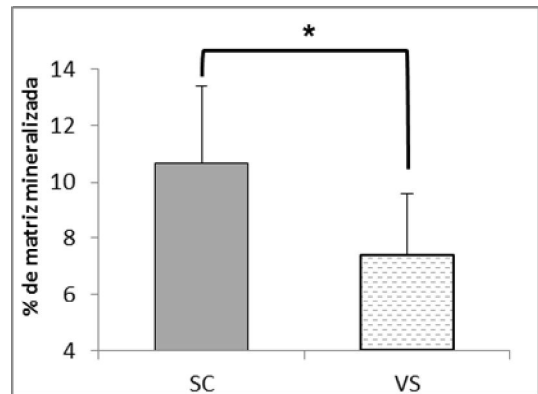
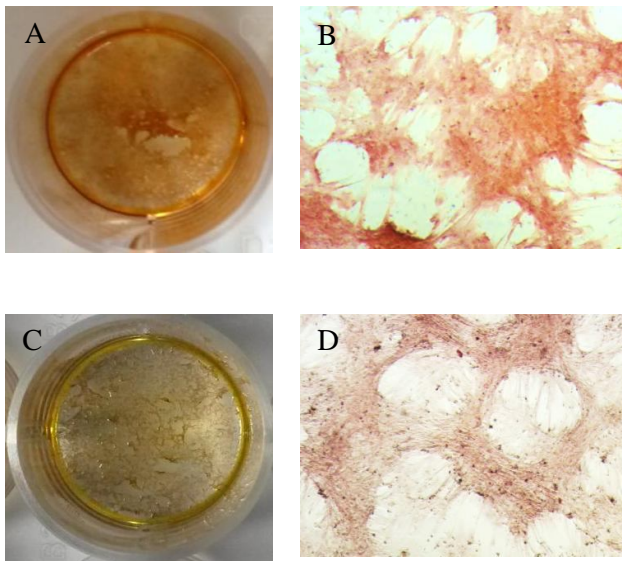


Figura 9. Comparación de la capacidad de síntesis de matriz ósea *in vitro* de las CMM-TA SC y VS P<sub>4</sub> (n=5 animales), se observa un mayor síntesis de matriz en las células provenientes de SC \*p<0,05. Imágenes macroscópicas y microscópicas (40x) de CMM-TA SC (A y B) y VS (C y D).

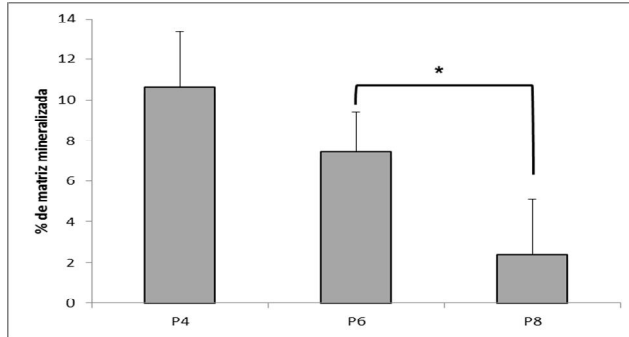
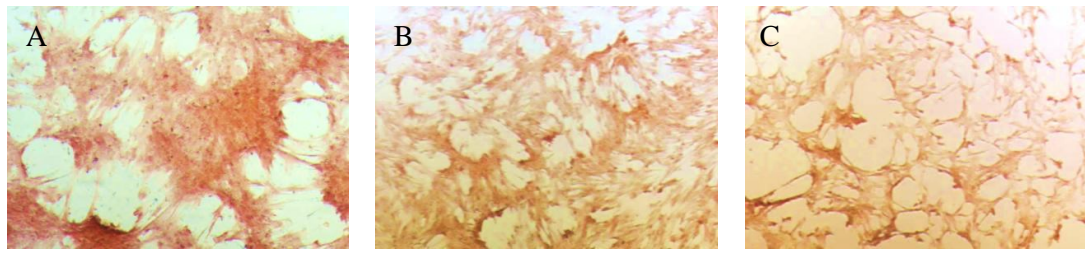


Figura 10. Comparación de la capacidad de síntesis de matriz ósea *in vitro* en diferentes pasajes (P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>) de las CMM-TA SC (n=5 animales). Se observa una diferencia significativa en los P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub> \*p<0,001. Imágenes microscópicas (40x) de P<sub>4</sub> (A), P<sub>6</sub> (B) y P<sub>8</sub> (C).

## 7. DISCUSIÓN

Para poder denominar a las células obtenidas de la fracción vascular estromal (FVE) de CMM, es necesario evaluar las características morfológicas, inmunofenotípicas y de multipotencialidad *in vitro*. En el presente trabajo, se utiliza el término de CMM dado que se cumplieron las recomendaciones de la ISCT para CMM (Bourin et al. 2013; Dominici et al. 2006) debido a que las células utilizadas de ambas fuentes presentaron morfología fibroblástica, adherencia al plástico, marcadores estromales mesenquimales CD44+, CD90+ y no CD45- y poseían la plasticidad *in vitro* para diferenciarse en el trilineaje (adiposo, cartilaginoso y óseo). Para animales domésticos el criterio de referencia es la tridiferenciación *in vitro*, debido a la escasa información que existe en la actualidad de los marcadores adecuados de CMM caninas y el difícil acceso a anticuerpos diseñados específicamente para la especie (Requicha et al. 2012; Takemitsu et al. 2012; Screven et al. 2014). La investigación sobre terapia celular en caninos tuvo una evolución interesante porque comenzó por describir trabajos de aplicación terapéutica de “CMM” sin una adecuada caracterización (Bruder et al. 1998; Arinzeh et al. 2003; Jung et al. 2009) y posteriormente retroceden con trabajos enfocados a la biología celular básica estudiando sus características *in vitro* (Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Requicha et al. 2012; Takemitsu et al. 2012; Guercio et al. 2013; Ock et al. 2013; Screven et al. 2014).

Nuestros resultados indicaron que la fuente VS posee una cantidad mayor de células de la FVE que la SC ( $25,10 \pm 18; 31,71 \times 10^6$  vs  $8,13 \pm 4,6; 13,75 \times 10^6$  células viables/gr de TA, media  $\pm$  DE). De todas formas, estos datos no nos dan la información de cuantas CMM poseemos en la muestra, debido a que tan solo son células nucleadas viables de la FVE. A la hora de la extracción quirúrgica es notoria la mayor carga vascular que posee el tejido VS comparado con el SC, coincidiendo con lo descrito por otras investigaciones (Requicha et al. 2012). Lo que nos inclina a explicar porque la fuente VS tendría una mayor cantidad FVE. De todas maneras

para confirmar esta observación sería necesaria una cuantificación vascular a nivel histológico.

Las CMM-TA provenientes de fuente SC presentaron una mayor habilidad proliferativa *in vitro*. Este resultado coincide con otros trabajos que vieron la misma diferencia a bajos pasajes en caninos ( Neupane et al. 2008; Guercio et al. 2013), humanos (Baglioni et al. 2012) y lepóridos (Peptan et al. 2006) utilizando métodos estándar, como cpdl (*cumulative population doubling level*), CFU-F, BrdU-5 (*Bromo-2'-deoxy-uridine*) y prueba de MTS (Baglioni et al. 2012; Guercio et al. 2013). En cambio, nosotros utilizamos un método alternativo denominado “nivel de habilidad proliferativa celular” que determina el tiempo y la cantidad total de células cosechadas, brindando una importante información en cuanto a plazos y cantidades de CMM que se obtendría de cada fuente, dato no menor a la hora de planificar una terapia celular en caninos. Nuestros resultados indican que en pasaje primario no existieron diferencias en el tiempo y la cantidad de células cosechadas comparando SC y VS. Similar a lo descrito por Guercio et al. (2013) que compararon CMM-TA SC y VS caninas y no encontraron diferencia entre ambas fuentes en pasaje primario, pero sí en pasajes no primarios, donde demuestran que la fuente SC posee un mayor poder de proliferación. Coincidiendo con nuestros resultados, que indican que la fuente SC presenta en los P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> un mayor poder de proliferación comparado con la VS. Lo que nos indica que, si pensamos en utilizar un banco de células criopreservadas para su aplicación autóloga/allogénica, con las células de origen SC potencialmente tendríamos una mayor eficiencia de crecimiento, teniendo ventajas desde el punto de vista tiempo, económicos en el mantenimiento del cultivo celular y mínimo discomfort para extraer el TA.

Es importante tener en cuenta que existe poco consenso sobre cuáles marcadores de superficie utilizar para evaluar por citometría de flujo las CMM-TA caninas (Martinello et al. 2011; Requicha et al. 2012; Screven et al. 2014). En cambio, para humanos y murinos ya están establecidos los marcadores de CMM (Dominici et al. 2006; Bourin et al. 2013). En base a estos antecedentes es que las CMM-TA caninas fueron inmunofenotipificadas a través de la combinación de dos marcadores positivos (CD44 y CD90) y uno negativo (CD45). CD44 es una glicoproteína involucrada en la adhesión y migración de CMM y el CD90 es una proteína de superficie utilizada como marcador de varias CM, ambos son marcadores de células estromales mesenquimales y deben estar presentes. En cambio CD45 es un marcador hematopoyético y debe estar ausente o en baja expresión.

Fue determinado que las CMM de origen SC y VS expresaron CD44 y CD90 en nivel alto e intermedio, mientras que expresaron niveles bajos o nulos de CD45. Otros autores describen similar patrón de expresión de estos marcadores en CMM-TA caninas (Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Takemitsu et al. 2012; Screven et al. 2014). En nuestras condiciones, >90 % de células expresaron CD44 para ambos orígenes, lo que coincide con otras investigaciones (Vieira et al. 2010; Takemitsu et al. 2012) pero Martinello et al. (2011) describe una expresión menor (88% para CMM-TA VS). En cambio, >50 % de las células expresaron CD90 para ambos orígenes, lo cual es superior al 35% (Martinello et al. 2011) y 22,55% (Takemitsu et al. 2012), mientras que Vieira et al. (2010) describe un 87% de células positivas y Screven et al. (2014) entre 10-40 o >40 % dependiendo del individuo analizado. Esta heterogeneidad de resultados puede deberse a que los anticuerpos no son específicamente diseñados para antígenos caninos. Otro factor que podría influir en esta divergencia de resultados puede atribuirse a que las células evaluadas

fueron de orígenes y pasajes diferentes: Takemitsu et al. (2012) utilizan CMM-TA SC (zona inguinal) en P<sub>2</sub>, Martinello et al. (2011) CMM-TA VS (zona periovárica) entre P<sub>3</sub>-P<sub>6</sub> y Screven et al. (2014) CMM-TA SC entre P<sub>3</sub>-P<sub>5</sub>. En nuestros resultados la presencia de CD90 fue similar en los P<sub>4</sub> y P<sub>8</sub> (57,2-68,4%) y se observó un aumento en el P<sub>6</sub>. Esta variación en la expresión del CD90 esta descrita en otros trabajos en caninos (Takemitsu et al. 2012; Screven et al. 2014) y otras especies (Gronthos et al. 2001; Katz et al. 2005; Mitchell et al. 2006; Riekstina et al. 2009). Estos resultados indican que este marcador no sería adecuado para inmunofenotipificar CMM caninas por su irregularidad de expresión. Por otro lado, se observó una expresión fuerte y estable de CD44 en los diferentes pasajes, lo que coincide con otros trabajos (Vieira et al. 2010; Takemitsu et al. 2012). Existió una baja expresión de CD45, lo que concuerda con otros autores (Vieira et al. 2010; Martinello et al. 2011; Takemitsu et al. 2012). Sin embargo, Requicha et al. (2012) plantean utilizar la técnica de PCR en tiempo real y medir la expresión de los genes pertenecientes a los marcadores de CMM, como alternativa a las dificultades para obtener anticuerpos específicos para células caninas. Ellos describen que los marcadores CD73, CD90 y CD105 decrecen a medida que aumentan los pasajes (evalúan P<sub>1</sub>-P<sub>4</sub>), en cambio nosotros encontramos el CD90 está presente en la superficie de las CMM inclusive en el P<sub>8</sub>. Por otro lado, Baglioni et al. (2009) encuentra una estabilidad en los marcadores de inmunofenotipificación hasta el P<sub>10</sub> en CMM-TA humanos. Lo que indica que el método de PCR en tiempo real tiene sus limitaciones para ser utilizado como método alternativo a la citometría de flujo porque no puede determinarnos sí el antígeno está o no presente en la superficie celular.

Las CMM-TA fueron inducidas a diferenciarse en linaje adiposo, cartilaginoso y óseo, evaluados por histoquímica. La diferenciación adiposa fue evaluada por la detección de vacuolas lipídicas marcadas con Oil Red O sugerido por varios autores (Vieira et al. 2010; Bourin et al. 2013). Nosotros observamos que las CMM-TA caninas presentaban escasas vacuolas lipídicas comparadas con CMM-TA de otras especies como humano (Baglioni et al. 2009) o murino (Terraciano et al. 2014), coincidiendo con la dificultad descrita por Vieira et al. (2010). Existen trabajos en caninos que no manifiestan esta dificultad pero las imágenes publicadas muestran escasa vacuolas lipídicas (Martinello et al. 2011; Takemitsu et al. 2012). Sin embargo, en el trabajo de Guercio et al. (2013) se puede apreciar en sus imágenes células con abundantes y grandes vacuolas. Los medios de inducción adiposa presentan una formulación diferente, esto podría explicar las diferencias en los resultados. Además existe una limitación en la histoquímica empleada para determinar la diferenciación adiposa, a través de la identificación de acúmulos lipídicos, se han visto acúmulos también en células que están diferenciándose en hepatocitos o células musculares (Zuk et al. 2002; Yun et al. 2012; Bourin et al. 2013). En el trabajo de Bourin et al. (2013) se sugiere agregar a la clásica detección de tridiferenciación por histoquímica, la medición de la expresión de genes y proteínas como biomarcadores de la diferenciación celular. Los biomarcadores descritos para detectar la diferenciación adiposa: adiponectina, C/EBPa, FABP4, leptina y PPARg; cartilaginosa: agregano, colágeno tipo II y Sox9 y para ósea: fosfatasa alcalina, sialoproteína; ósea: osteocalcina, Osterix, Runx2.

En nuestro trabajo se observaron tendencias para los tres linajes (adiposo p=0,091, cartilagosos p=0,095 y óseo p=0,091) indicando que las células provenientes de SC posee una mayor proporción de cultivos diferenciados. Potencialmente, si se

contara con un número mayor de individuos y más repeticiones por ensayo se podría distinguir estas tendencias como diferencias. Otros autores consiguieron hallar diferencias entre ambas fuentes a través de la evaluación de expresión génica con el compromiso hacia el linaje óseo (Requicha et al. 2012). Por otro lado, otros trabajos indican que las CMM-TA de ambas fuentes poseen similar plasticidad *in vitro* (Baglioni et al. 2009; Guercio et al. 2013). Entonces, para apreciar estas leves diferencias entre ambas fuentes se debería evaluar la plasticidad *in vitro* asociada al estudio de biomarcadores de compromiso celular con el linaje inducido a nivel génico.

Cuando fue cuantificada la matriz mineralizada *in vitro* a través de imágenes microscópicas, sí se consiguieron observar diferencias significativas entre ambas fuentes. La fuente SC tenía mayor porcentaje de matriz que la fuente VS ( $10,67 \pm 2,76$  vs  $7,41 \pm 2,18\%$ ). Este método de cuantificación por imágenes ya ha sido descrito anteriormente (Baglioni et al. 2009; Peptan, Hong, and Mao 2006). Nuestros resultados discrepan con los resultados de Peptan et al. (2006) que encuentra un mayor porcentaje de matriz mineraliza en CMM-TA VS ( $35,25 \pm 6,36\%$ ) que en SC ( $15,16 \pm 3,51\%$ ) en lepóridos. Las diferencias podrían darse porque las especies estudiadas son diferentes, la tinción utilizada fue von Kossa y por último, la evaluación fue realizada en P<sub>1</sub>. En cambio, nosotros utilizamos Alizarin Red S y la evaluación fue hecha en P<sub>4</sub>. Como antecedente en células humanas tenemos el trabajo de Baglioni et al. (2009) que evalúa CMM-TA SC y VS entre los P<sub>1</sub>-P<sub>4</sub> y no encontraron diferencias en el potencial osteogénico de ambas fuentes, discrepando con nuestros resultados. Sin embargo, otros investigadores encontraron que la fuente SC poseía mayor expresión génica de biomarcadores (COLIA1 y RUNX2) de diferenciación ósea, en CMM-TA caninas (Requicha et al. 2012) y humanas (Baglioni et al. 2012).

Los pasajes celulares afectaron de manera diferente a las CMM-TA SC y VS. El linaje VS presentó multipotencialidad en el trilineaje hasta P<sub>4</sub>, en cambio el SC presentó hasta el P<sub>8</sub>, con una reducción acentuada entre P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>. En el trabajo de Requicha et al. (2012) describen que las CMM-TA caninas comienzan a perder su multipotencialidad a partir del P<sub>3</sub>, basándose en la medición de expresión de genes biomarcadores. En cambio, Guercio et al. (2013) describen que algunos linajes de CMM-TA caninas conservan su multipotencialidad hasta P<sub>6</sub>. Esta última descripción coincide con nuestras observaciones del linaje SC que mostró una gran reducción de su plasticidad entre P<sub>6</sub>-P<sub>8</sub>, posiblemente se deba a que las células entraron en senescencia y por eso la categoría predominante en P<sub>8</sub> fue “no creció”. Coincide con lo descrito por Martinello et al. (2011) que las CMM-TA caninas a partir del P<sub>8</sub> presentan una drástica reducción de la telomerasa, lo cual es indicador de que a partir de ese pasaje las células entrarían en fase de senescencia. Sin embargo, Zuk et al. (2001) describe en humanos que las CMM-TA muestran un incremento de células senescentes a partir del P<sub>15</sub>, mostrando que existen diferencias entre especies sobre la longevidad de los cultivos. Profundizar sobre el conocimiento de cuando las células entran en estado de senescencia y pierden su plasticidad es de suma importancia pensando en la aplicación terapéutica de las CMM. Si se desea aplicar CMM con todas sus características terapéuticas, encontramos que el linaje SC permite extender su uso en altos pasajes (>P<sub>3</sub>) porque conservan su plasticidad *in vitro*. Permitiendo reducir el uso de animales para extracción de TA comparado con utilizar CMM en bajos pasajes ( $\leq P_3$ ) para terapia celular. Sin embargo, para poder determinar hasta que pasaje celular sería recomendable utilizar las CMM-TA *in vivo*

deberían evaluarse otras características atractivas como su potencial inmunomodulador, angiogénico y antimicrobiano.

## 8. CONCLUSIONES

Los linajes SC y VS presentaron una plasticidad *in vitro* diferente, el linaje SC conservó su multipotencialidad hasta P<sub>8</sub>, en cambio el VS solo la presentó hasta el P<sub>4</sub>. La fuente SC posee ventajas sobre la VS, debido a que las CMM-TA presentan mayor habilidad proliferativa, preservan su plasticidad en altos pasajes, tienen mayor capacidad de sintetizar matriz ósea *in vitro* y su extracción es menos invasiva. Describimos por primera vez un método alternativo para evaluar la habilidad proliferativa de las CMM-TA, determinando tiempo y cantidad final de células cosechadas.

## 9. PERSPECTIVAS

Del presente trabajo surgen nuevas interrogantes que se planea resolver en el futuro, como el análisis vascular del TA SC y VS para determinar si existe mayor carga vascular en alguna de las fuentes.

Realizar una caracterización más amplia con el empleo de *Stemness marker* y biomarcadores celulares de compromiso con los linajes estudiados (adiposos, cartilagosos y óseos).

Evaluar la estabilidad citogenética de las CMM-TA en diferentes pasajes.

Nuevas investigaciones deberían ser abordadas para evaluar si las diferencias halladas en el potencial osteogénico *in vitro* se mantiene *in vivo* cuando son aplicadas CMM-TA con fines terapéuticos.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26: 1276–1284.
2. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. (2004). Stromal Cell–derived Factor-1 $\alpha$  Plays a Critical Role in Stem Cell Recruitment to the Heart after Myocardial Infarction but Is Not Sufficient to Induce Homing in the Absence of Injury. *Circulation* 110: 3300–3305.
3. Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-Shal AS, Raafat N, Shabrawy SM, Awad HA, Amer MG, Gharib MA, El Gendy EA, Raslan AA, El-Kelawy HM. (2013). Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 15: 64–75.

4. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Hérodin F, Meineke V, Drouet M. (2010). Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Exp Hemato* 38: 945–956.
5. Amorin B1, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, da Silva MA, Wieck A, Silla L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: A Review. *Human cell* 27:137–150.
6. An SY, Han J, Lim HJ, Park SY, Kim JH, Do BR, Kim JH. (2014). Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 46:127–135.
7. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 62:1131–1141.
8. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321:699–702.
9. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. (2003). Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85:1927-1935.
10. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 964–966.
11. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Dev* 17:126–140.
12. Azari O, Babaei H, Derakhshanfar A, Nematollahi-Mahani SN, Poursahebi R, Moshrefi M. (2011). Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation. *Vet Rese Commun* 35:211–222.
13. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3908–3913.
14. Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M. (2012). Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS ONE* 7 : (5).
15. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. (2009). Characterization of human adult

stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *The FASEB journal* 23:3494–3505.

16. Balesdent Barreira, AP, Alves AL, Salto, ME, Arnorint RL, Kohayagawa A, Menarim BC, Mota LS. (2008). Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *International Journal of Applied Research In Veterinary Medicine*: 46–54.
17. Bao L, He L, Chen J, Wu Z, Liao J, Rao L, Ren J, Li H, Zhu H, Qian L, Gu Y, Dai H, Xu X, Zhou J, Wang W, Cui C, Xiao L. (2011). Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Research* 21:600–608.
18. Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, de Lavareille A, Vanderheyden M, Kaluzhny Y, Mazouz N, Willemsen P, Penicka M, Mathieu M, Homsy C, De Bruyne B, McEntee K, Lee IW, Heyndrickx GR. (2007). Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:1095–1104.
19. Bellantuono I. (2004). Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 607–20.
20. Belmadani A, Tran PB, Ren D, Assimacopoulos S, Grove EA, Miller RJ. (2005). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J Neurosci* 25:3995–4003.
21. Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA, Loring JF. (2011). Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods* 8:829–31.
22. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase ii study. *Lancet* 371:1579–1586.
23. Boomsma RA, Geenen DL. (2012). Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PloS one* 7(4).
24. Bošković A, Eid A, Pontabry J, Ishiuchi T, Spiegelhalter C, Raghu Ram EV, Meshorer E, Torres-Padilla ME. (2014). Higher chromatin mobility supports totipotency and precedes pluripotency in vivo. *Genes Dev* 28:1042–1047.
25. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. (2013). Stromal Cells from the Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction and Culture Expanded Adipose Tissue-Derived Stromal/stem Cells: A Joint Statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641–48.



26. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, Martens W, Lambrechts I. (2013). Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS One* 8(8).
27. Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, Lambrechts I. (2014). Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther* 143:181–196.
28. Bruel A, Christensen E, Trantum-Jensen Qvortup K, Geneser F. (2014) *Geneser Histología*. Ed. Médica Panamericana, 4<sup>a</sup> ed. Cap. 9, pp. 227-232
29. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects the effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80:985-996.
30. Buckwalter JA, Mankin HJ. (1997). Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Ins Course Lec* 47:487–504.
31. Burton A, Muller J, Tu S, Padilla-Longoria P, Guccione E, Torres-Padilla ME. (2015). Single-cell profiling of epigenetic modifiers identifies PRDM14 as an inducer of cell fate in the mammalian embryo. *Cell Rep* 5:687–701.
32. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396–2402.
33. Caplan AI. 1991. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res* 9:641–50.
34. Carette JE1, Pruszk J, Varadarajan M, Blomen VA, Gokhale S, Camargo FD, Wernig M, Jaenisch R, Brummelkamp TR. (2010). Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 115:4039–4042.
35. Cavaglieri RC, Martini D, Sogayar MC, Noronha IL. 2009. Mesenchymal Stem Cells Delivered at the Subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *In Transplant Proc* 49:947–951.
36. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. (2003). Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643–655.
37. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. (2003). Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 73:778–86.
38. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. (2001a). Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res* 189:49–57.

39. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. (2001b). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005–1011.
40. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. (2008). Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PloS one* 3(4).
41. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. (2006). Location of Putative Stem Cells in Human Periodontal Ligament. *J Periodontal Res* 41:547–553.
42. Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 25:6031–6046.
43. Cho YB, Park KJ, Yoon SN, Song KH, Kim do S, Jung SH, Kim M, Jeong HY, Yu CS. (2015). Long-term results of adipose-derived stem cell therapy for the treatment of Crohn’s fistula. *Stem cells transl med* 4:532–537.
44. Choi M, Lee HS, Naidansaren P, Kim HK, O E, Cha JH, Ahn HY, Yang PI, Shin JC, Joe YA. (2013). Proangiogenic features of wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *nt J Biochem Cell Biol* 45:560–570.
45. Ciccocioppo R, Gallia A, Sgarella A, Kruzliak P, Gobbi PG, Corazza GR. (2015). Long-term follow-up of Crohn disease fistulas after local injections of bone marrow–derived mesenchymal stem cells. *Mayo Clin Proc* 90:747–55.
46. Covas DT. (2007) Células-Tronco Mesenquimais. En: Zago MA & Covas DT. (2007) Células-Tronco a nova fronteira da medicina. Ed. Atheneu 1ª ed. São Paulo, Cap. 3, pp.35-49.
47. da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. (2009). MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 15:221–229.
48. de Mattos Carvalho A, Alves AL, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, de Oliveira PG, Deffune E. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 132:303–306.
49. de Mattos Carvalho A, Alves AL, de Oliveira PG, Álvarez LE, Amorim RL, Hussni CA, Deffune E. (2011). Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *Journal of Equine Veterinary Science* 31:26–34.
50. Deng Y, Liu Q, Luo C, Chen S, Li X, Wang C, Liu Z, Lei X, Zhang H, Sun H, Lu F, Jiang J, Shi D. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors. *Stem Cells Dev* 21:2485–2494.

51. Despons C, Ding S. (2010). Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol* 636:207-218.
52. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
53. Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK. (2000). Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J* 32:369–378.
54. Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, Barry F, Nerem RM. (2009). Bone marrow–derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time-and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A* 15:2459–2470.
55. Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 284: 17634–41760.
56. Evans MJ, Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
57. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83:192–203.
58. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3:393–403.
59. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo.” *Transplantation* 17:331–340.
60. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. (1968) Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation* 6:230–247.
61. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:348–362.
62. Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur JP. (2011). Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone* 49: 1005–1009.
63. Gay IC, Chen S, MacDougall M. (2007). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*10:149–160.

64. Gonçalves F, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B, Lopez PL, Passos EP, Cirne-Lima EO, Meurer L, Paz AH. (2014). Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol* 20:18228-18239.
65. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 58:929-939.
66. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54–63.
67. Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. (2011). Induced pluripotent stem cells—opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10: 915–929.
68. Guercio A, Di Bella S, Casella S, Di Marco P, Russo C, Piccione G. (2013). Canine mesenchymal stem cells ( MSCs ): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int* 37:789–798.
69. Gurdon, JB. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10:622–640.
70. Han X, Han J, Ding F, Cao S, Lim SS, Dai Y, Zhang R, Zhang Y, Lim B, Li N. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells. *Cell Res* 21:1509–1512.
71. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133:250–64.
72. Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. (2006). Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 73: 298–305.
73. Hemberger M, Dean W, Reik W. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington’s canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:526–537.
74. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2199–2204.
75. Honma T, Honmou O, Iihoshi S, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. (2006). Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp Neurol* 199:56–66.

76. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393–395.
77. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. 2007. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the pi3k-akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 25:2363–2370.
78. Imanishi Y, Saito A, Komoda H, Kitagawa-Sakakida S, Miyagawa S, Kondoh H, Ichikawa H, Sawa Y. (2008). Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 44:662–671.
79. Ivanova NB1, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. (2002). A Stem Cell Molecular Signature. *Science* 298: 601–604.
80. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. 2012. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Res Ther* 3(3): 20.
81. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7:197–199.
82. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896–904.
83. Jones BJ, McTaggart SJ. (2008). Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol* 36:733–741.
84. Jung DI, Ha J, Kang BT, Kim JW, Quan FS, Lee JH, Woo EJ, Park HM. (2009). A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J Neurol Sci* 285:67–77.
85. Jung DI, Ha J, Kim JW, Kang BT, Yoo JH, Park C, Park, HM. (2008). Canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow: isolation, characterization, multidifferentiation, and neurotrophic factor expression *in vitro*. *Journal of Veterinary Clinics* 25:458–465.
86. Kachgal S, Putnam AJ. (2011). Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis* 14:47–59.
87. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell transplantation* 6:125–134.
88. Kadota Y, Yagi H, Inomata K, Matsubara K, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Shinoda M, Obara H, Itano O, Kitagawa Y. (2014). Mesenchymal stem

cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis* 10:268–277.

89. Kahn LH, Kaplan B, Monath TP, Steele JH. (2008). Teaching ‘one Medicine, One Health’. *Am J Med* 121:169–170.
90. Kamishina H, Deng J, Oji T, Cheeseman JA, Clemmons RM. 2006. Expression of neural markers on bone marrow–derived canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 67:1921–1928.
91. Kang KS1, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H 2005. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human uc blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: A Case Study. *Cytotherapy* 7:368–373.
92. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. (2005). Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23:412–23.
93. Kern, Susanne, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Klüter, and Karen Bieback. 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 24: 1294–1301.
94. Khosrotehrani K. (2013). Mesenchymal stem cell therapy in skin: Why and What For? *Exp Dermatol* 22:307–310.
95. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472–476.
96. Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Schöler HR. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461:649–653.
97. Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH. (2008). An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell* 132:1049–1061.
98. Kim JW, Hoffman JP, Alpaugh RK, Rhim AD, Reichert M, Stanger BZ, Furth EE, Sepulveda AR, Yuan CX, Won KJ, Donahue G, Sands J, Gumbs AA, Zaret KS. (2013a). An iPSC Line from Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoes Early to Invasive Stages of Pancreatic Cancer Progression. *Cell Rep* 3:2088–2099.
99. Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM. (2013b). The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol* 24:242–253.
100. Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, Kim JM, Kim MH. (2013c). Amniotic mesenchymal stem cells with robust chemotactic properties are effective in the treatment of a myocardial infarction model. *Int J Cardiol* 168:1062–1069.

101. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. (2004a). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 94:678–685.
102. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. (2004b). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109:1543–1549.
103. Ko SH, Nauta A, Wong V, Glotzbach J, Gurtner GC, Longaker MT. (2011). The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg.* 127:10–20.
104. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200:123–135.
105. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, Matthay MA. (2010). Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells* 28: 2229–2238.
106. Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119:6234–6242.
107. Kumar D, Talluri TR, Anand T, Kues WA. (2015). Induced pluripotent stem cells: mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. *World J Stem Cells* 7: 315-328.
108. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ, Gilliet M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449: 564–569.
109. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD. (2006). Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12:2093–2104.
110. Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. (2009a). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen* 17:540–547.
111. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain

- M, Studer L. (2009b). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461.
112. Lee SR, Lee SH, Moon JY, Park JY, Lee D, Lim SJ, Jeong KH, Park JK, Lee TW, Ihm CG. (2010). Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. *Ren Fail* 32:840–848.
  113. Letouzey V, Tan KS, Deane JA, Ulrich D, Gurung S, Ong YR, Gargett CE. (2015). Isolation and characterisation of mesenchymal stem/stromal cells in the ovine endometrium. *Plos One* 10(5).
  114. Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao L. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4:11–15.
  115. Liew A, O'Brien T. (2012). Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Res Ther* 3(4): 28.
  116. Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. (2007). Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci* 8: 275–282.
  117. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. (2008). Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 26:279–289.
  118. Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3:587–590.
  119. Locke M, Feisst V, Dunbar PR. (2011). Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 29: 404–411.
  120. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchiew J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2883–2888.
  121. Magrisso A (2014). Efeitos Do Tratamento Com Células-Tronco Mesenquimais Administradas Pelas Vias Intraperitoneal E Intravenosa Em Modelo Experimental de Sepse Aguda. Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
  122. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest*. 103:697–705.



123. Martin, GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634–7638.
124. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, Decaminada M, Patruno M. (2011). Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci* 91:18–24.
125. Martínez-Lorenzo MJ, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T, García-Alvarez F, Larrad L. (2009). Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J Orthop Res* 27:1499–1507.
126. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9:625–635.
127. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. (2003). Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 34:476–488.
128. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. (2011). Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 27: 1552–1561.
129. McLaren D, Gorba T, Marguerie de Rotrou A, Pillai G, Chappell C, Stacey A, Lingard S, Falk A, Smith A, Koch P, Brüstle O, Vickers R, Tinsley J, Flanders D, Bello P, Craig S. (2012). Automated large-scale culture and medium-throughput chemical screen for modulators of proliferation and viability of human induced pluripotent stem cell-derived neuroepithelial-like stem cells. *J Biomol Screen* 18:258-268.
130. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. (2010). Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182:1047–1057.
131. Mertens J, Stüber K, Wunderlich P, Ladewig J, Kesavan JC, Vandenberghe R, Vandenbulcke M, van Damme P, Walter J, Brüstle O, Koch P. (2013). APP Processing in human pluripotent stem cell-derived neurons is resistant to NSAID-based secretase modulation. *Stem Cell Reports* 1: 491–498.
132. Millis DL, Jackson AM. (2006). Uniones demoradas, no uniones y maluniones. En: Slatter D. *Tratado de Cirugía en Pequeños Animales* 3a. ed. Buenos Aires, Inter-Médica Cap. 15, pp.2116-2129.
133. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal

- changes in stromal-associated and stem cell associated markers. *Stem Cells* 24:376–385.
134. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. (2003). Matrix Cells from Wharton’s Jelly Form Neurons and Glia. *Stem cells* 21:50–60.
  135. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES Cells. *Cell* 113:631–642.
  136. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124:1929–1939.
  137. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48:3464–3474.
  138. Nagy K, Sung HK, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Michael IP, Smith LC, Nagy A. (2011). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. *Stem Cell Rev* 7: 693–702.
  139. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF. (2005). Human bone marrow–derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65:3307–3318.
  140. Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 14152-14157.
  141. Nandi N, Alfonso Z. (2007) *Células-Tronco a nova fronteira da medicina*. Ed. Atheneu 1ª ed. São Paulo, Cap 4, pp49-66.
  142. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2–dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Med* 15:42–49.
  143. Neupane M, Chang CC, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. (2008). Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 14:1007–1015.
  144. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379–391.
  145. Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. 2010. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous

- setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater* 6: 900–908.
146. Nijnik A, Hancock RE. 2009. The Roles of Cathelicidin LL-37 in Immune Defences and Novel Clinical Applications. *Curr Opin Hematol* 16:41–47.
  147. Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Harada Y, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. (2012). Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal cord injury. *Vet Surg* 41:437–442.
  148. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460:118–122.
  149. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193–199.
  150. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res* 69:928–937.
  151. Nobert KM. (2011). The regulation of veterinary regenerative medicine and the potential impact of such regulation on clinicians and firms commercializing these treatments. *Vet Clin North Am Equine Pract* 27: 383–391.
  152. Ock SA, Maeng GH, Lee YM, Kim TH, Kumar BM, Lee SL, Rho GJ. (2013). Donor-matched functional and molecular characterization of canine mesenchymal stem cells derived from different origins. *Cell Transplant* 22: 2311–2321.
  153. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. (2008). The Anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem cells* 26: 1047–1055.
  154. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C. (2004). Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 187:266–278.
  155. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. (2010). Generation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells with Plasmid Vectors. *Nature Prot* 5: 418–428.
  156. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313–317.
  157. One Health Initiative. disponible en:  
<http://www.onehealthinitiative.com> fecha de consulta 10/06/2015.

158. Online Mendelian Inheritance of Animals (OMIA). Faculty of Veterinary Science, University of Sydney and Australian National Genomic Information Service. disponível em: <http://omia.angis.org.au/home/> fecha de consulta: 1/06/2015.
159. Opitz CA, Litzemberger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppel A, Tolosa E, Hoberg M, Anderl J, Aicher WK, Weller M, Wick W, Platten M. (2009). Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2, 3-dioxygenase-1 via interferon- $\beta$  and protein kinase R. *Stem Cells* 27:909–919.
160. Owen M. (1985). Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *Bone and mineral research* 3:1–25.
161. Owen M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 10: 63–76.
162. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng* 13:2949–2955.
163. Panoskaltsis N, Mantalaris A, Wu JH. (2005). Engineering a mimicry of bone marrow tissue *ex vivo*. *Journal of bioscience and bioengineering* 100:28–35.
164. Pendleton C, Li Q, Chesler DA, Yuan K, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. (2013). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PLoS ONE* 8(3).
165. Peptan IA, Hong L, Mao JJ. (2006). Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *117: 1462–70*.
166. Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, Litovsky S, Lin J, Vaughn WK, Coulter S, Fernandes MR, Willerson JT. (2008). Comparison of Intracoronary and Transendocardial Delivery of Allogeneic Mesenchymal Cells in a Canine Model of Acute Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* 44:486–495.
167. Pererira V. (2007). Células-Tronco: Origens e Propiedades. En: Zago MA & Covas DT. (2007) Células-Tronco a nova fronteira da medicina. Ed. Atheneu 1ª ed. São Paulo, Cap. 1, pp.21-3.
168. Petrakova KV, Tolmacheva AA, Fridenshtein A. (1963). Osteogenesis following transplantation of marrow in diffusion chambers. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 56(6): 1375–1378.
169. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, Cohen IR, Zipori D. (2007). Toll-like

- receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 109:1422–1432.
170. Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Doronin SV. (2007). Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 25:1761–1768.
171. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Human reproduction* 18:1489–1493.
172. PubMed. United States National Library of Medicine (NLM). disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> fecha de consulta: 1/06/2015.
173. Qiu C, Ma Y, Wang J, Peng S, Huang Y. 2010. Lin28-mediated post-transcriptional regulation of oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic acids research* 38:1240–1248.
174. Quattrocchi M, Cassano M, Crippa S, Perini I, Sampaolesi M. (2010). Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differ* 17:1222–1229.
175. uesenberry PJ, Crittenden RB, Lowry P, Kittler EW, Rao S, Peters S, Stewart FM. 1993. In vitro and in vivo studies of stromal niches. *Blood cells* 20: 97–104.
176. Quimby JM, Dow SW. (2015). Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: a critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *Vet J* 204: 241–246.
177. Quimby JM, Webb TL, Gibbons DS, Dow SW. (2011). Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg* 13:418–426.
178. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 305:33–41.
179. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. (2008). dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 901–913.
180. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292–1298.
181. Ren J, Pak Y, He L, Qian L, Gu Y, Li H, Rao L, Liao J, Cui C, Xu X, Zhou J, Ri H, Xiao L. (2011). Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming. *Cell Res* 21: 849–853.

182. Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME. (2012). Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev* 8:1211–1222.
183. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. (2007). Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol* 25:409–416.
184. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 5:378–386.
185. Rosselló RA, Chen CC, Dai R, Howard JT, Hochgeschwender U, Jarvis ED. (2013). Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species. *Elife* 2: e00036.
186. Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, Kim WH, Kweon OK. (2012). Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton`s jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *J Vet Med Sci* 74:1617–1630.
187. Sartori C, DiDomenico AI, Thomson AJ, Milne E, Lillico SG, Burdon TG, Whitelaw CB. (2012). Ovine-induced pluripotent stem cells can contribute to chimeric lambs. *Cell Reprogram* 14:8–19.
188. Schneider MR, Adler H, Braun J, Kienzle B, Wolf E, Kolb HJ. (2007). Canine embryo-derived stem cells—toward clinically relevant animal models for evaluating efficacy and safety of cell therapies. *Stem Cells* 25:1850–1851.
189. Schulz K. (2009). Fundamento de la cirugía ortopédica y manejo de las fracturas. En Fossum, T., Hedlund, C., Jhonson, A., Schulz, K., Seim, H., Willard, R., Bahr, A., Carroll, G. *Cirugía en pequeños animales*. 3a. ed. Barcelona, Elseiver Cap. 31, pp. 1333-1356
190. Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC, Borjesson DL, Zhu M. (2014). Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol* 116:21–31.
191. Scuteri A, Miloso M, Foudah D, Orciani M, Cavaletti G, Tredici G. (2011). Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair? *Curr Stem Cell Res Ther* 6:82–92.
192. Seeberger KL, Eshpeter A, Korbitt GS. (2011). Isolation and culture of human multipotent stromal cells from the pancreas. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications* 123–140.
193. Semiglia, G, Filomeno A, Yaneselli K, Zunino J, Benavides U, Maisonnave J. (2014). First regenerative treatment in Uruguay with

mesenchymal stromal cells of a non-union femoral bone defect in a canine. *Veterinaria (Montevideo)* 50:65–77.

194. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155.
195. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73:1919–1926.
196. Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T. (2010). Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev* 77(1): 2.
197. Skardal A, Mack D, Kapetanovic E, Atala A, Jackson JD, Yoo J, Soker S. (2012). Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Transl Med* 1:792–802.
198. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Bio* 18:890–894.
199. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132–141.
200. Suter SE. (2011). Collection of peripheral blood CD34+ progenitor cells from healthy dogs and dogs diagnosed with lymphoproliferative diseases using a Baxter-Fenwal CS-3000 Plus blood cell separator. *J Vet Intern Med* 25:1406–1413.
201. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
202. Takahashi K, Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
203. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 8:150.
204. Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakt LM, Kawamata S. (2010). Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp Hematol* 38:154–162.
205. Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. (2009). Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells* 27:1802–1811.

206. Taylor SE, Smith RK, Clegg PD. (2007). Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J* 39:172–180.
207. Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, Laurino C, Passos E, Paz AH, Cirne-Lima E. (2014). Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells Int* 1–8.
208. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147.
209. Thomas ED, Storb R. (1999). The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editors. *Hematopoietic cell transplantation*. Boston: Blackwell Science, Cap. 1, pp.1–11
210. Till JE, McCulloch EA. (1961). A Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213–222.
211. Tlsty TD, Hein PW. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 11:54–59.
212. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105:93–98.
213. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Bio* 3:778–784.
214. Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 26:99–107.
215. Tomita Y, Makino S, Hakuno D, Hattan N, Kimura K, Miyoshi S, Murata M, Ieda M, Fukuda K. (2007). Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Med Biol Eng Comput* 45:209–220.
216. Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. (2007). Histone arginine methylation regulates cell fate and pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445: 214–218.
217. Trayhurn P, Beattie JH. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329–339.
218. Vaags AK, Rosic-Kablar S, Gartley CJ, Zheng YZ, Chesney A, Villagómez DA, Kruth SA, Hough MR. (2009). Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with *in vitro* and *in vivo* differentiation potential. *Stem cells* 27:329–340.



219. Van LR, Roncari DA. (1977). Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell Tissue Res* 181:197–203.
220. van Kempen LC, Ruiters DJ, van Muijen GN, Coussens LM. (2003). The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 82:539–548.
221. Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ. (2012). Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology* 77:220–228.
222. Vidor S (2015). Células Tronco Mesenquimais de Origem Adiposa Associadas a Enxertos Livres de Pele de Espessura Total Em Modelo Murino. UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
223. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. (2010). Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 19:279–289.
224. Villanueva S, Carreño JE, Salazar L, Vergara C, Strodthoff R, Fajre F, Céspedes C, Sáez PJ, Irrázabal C, Bartolucci J, Figueroa F, Vio CP. (2013). Human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue reduce functional and tissue damage in a rat model of chronic renal failure. *Clin Sci (Lon)* 125:199–210.
225. Volk SW, Theoret C. (2013). Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen* 21:382–394.
226. Volk SW, Wang Y, Hankenson KD. (2012). Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cell properties: Implications for MSC-Based Therapies. *Cell Transplant* 21:2189–2200.
227. Walia B, Satija N, Tripathi RP, Gangenahalli GU. (2012). Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 8:100–115.
228. Walsh CJ, Goodman D, Caplan AI, Goldberg VM. (1999). Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng* 5:327–337.
229. Wang, X, Dai J. (2010). Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells* 28:885–893.
230. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618–630.
231. Weiss ML, Troyer DL. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2:155–162.

232. Weissman IL. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157–168.
233. West FD, Uhl EW, Liu Y, Stowe H, Lu Y, Yu P, Gallegos-Cardenas A, Pratt SL, Stice SL. (2011). Brief Report: chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs.” *Stem Cells* 29:1640–1643.
234. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. (2007). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells* 9: 3–7.
235. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766–770.
236. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH (1999). Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res* 367:312–323.
237. Wrage PC1, Tran T, To K, Keefer EW, Ruhn KA, Hong J, Hattangadi S, Treviño I, Tansey MG. (2008). The neuro-glial properties of adipose-derived adult stromal (ADAS) cells are not regulated by notch 1 and are not derived from neural crest lineage. *PLoS One* 3(1).
238. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. 2007. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells* 25: 2648–2659.
239. Xu X1, Lei Y, Luo J, Wang J, Zhang S, Yang XJ, Sun M, Nuwaysir E, Fan G, Zhao J, Lei L, Zhong Z. (2013). Prevention of B-amyloid induced toxicity in human iPS cell-derived neurons by inhibition of cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. *Stem Cell Res* 10:213–227.
240. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Erickson K. (2013). Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Veterinary Medicine: Research & Reports* 4:39–44.
241. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Díaz H, Rial A, Muñoz N, Moreno M, Magrisso A, Oliveira F, Gonçalves F, Pizzato S, Cirne-Lima E, Maisonnave J. (2014). Caracterización y aplicación terapéutica de células estromales mesenquimales multipotentes caninas en medicina regenerativa veterinaria. XV Jornadas de la SUB, 5-7, Setiembre, Piriápolis, Uruguay. P-29.
242. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular Immunol* 259:150–156.
243. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797–801.

244. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. 1995. Developmental-specific activity of the fgf-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3." *Genes Dev* 9:2635–2645.
245. Yun IS, Jeon YR, Lee WJ, Lee JW, Rah DK, Tark KC, Lew DH. (2012). Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatol Surg* 38:1678–1688.
246. Zago MA. (2007). Células-Tronco: Origens e Propiedades. En: Zago MA & Covas DT. (2007) Células-Tronco a nova fronteira da medicina. Ed. Atheneu 1ª ed. São Paulo, Cap. 1, pp.3-21
247. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, Liu B, Yu X. (2012). Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 50:325–330.
248. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Experimental neurology* 174:11–20.
249. Zhu Y, Hu HL, Li P, Yang S, Zhang W, Ding H, Tian RH, Ning Y, Zhang LL, Guo XZ, Shi ZP, Li Z, He Z. (2012). Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS Cells): an *in vitro* and *in vivo* study. *Asian J Androl* 14:574–579.
250. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228.
251. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Bio Cell* 13:4279–4295.
252. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2:477–488.

## 11. ANEXO

### Anexo I

Cuadro I. Habilidad proliferativa de las CMM-TA en P<sub>0</sub>

Fuente	Siembra células x10 <sup>5</sup> /cm <sup>2</sup>	Tiempo de pasaje (días)	Células cosechadas (x10 <sup>4</sup> /cm <sup>2</sup> )
SC	4	5,70 ± 0,47	12,61 ± 1,50
	6	5,36 ± 0,47	11,23 ± 1,02
	8	5,19 ± 0,43	11,69 ± 1,02
VS	4	6,17 ± 0,41	10,25 ± 1,41
	6	5,82 ± 0,42	10,46 ± 0,77
	8	5,18 ± 0,42	10,82 ± 0,84

Media±DE

### Anexo II

Cuadro II. Habilidad proliferativa de las CMM-TA en P<sub>1</sub>- P<sub>3</sub>

Fuente	Siembra (células x10 <sup>4</sup> /cm <sup>2</sup> )	Pasaje	Tiempo de pasaje (días)	Células cosechadas (x10 <sup>4</sup> /cm <sup>2</sup> )
SC	2	1	4,09 ± 0,68	11,36 ± 3,37
	2	2	4 ± 0,75	10,98 ± 2,68
	2	3	4,45 ± 0,67	11,61 ± 2,48
	4	1	3 ± 0,43	10,75 ± 3,12
	4	2	3,09 ± 0,29	13,64 ± 3,24
	4	3	3,27 ± 0,45	12,23 ± 4,28
VS	2	1	5,10 ± 0,84	8,68 ± 2,74
	2	2	5,36 ± 0,78	6,09 ± 1,77
	2	3	5,60 ± 0,93	7,21 ± 2,38
	4	1	4,27 ± 0,76	9,67 ± 2,40
	4	2	4,55 ± 0,90	8,91 ± 2,72
	4	3	4,36 ± 0,90	7,60 ± 2,36

Media±DE

Anexo III

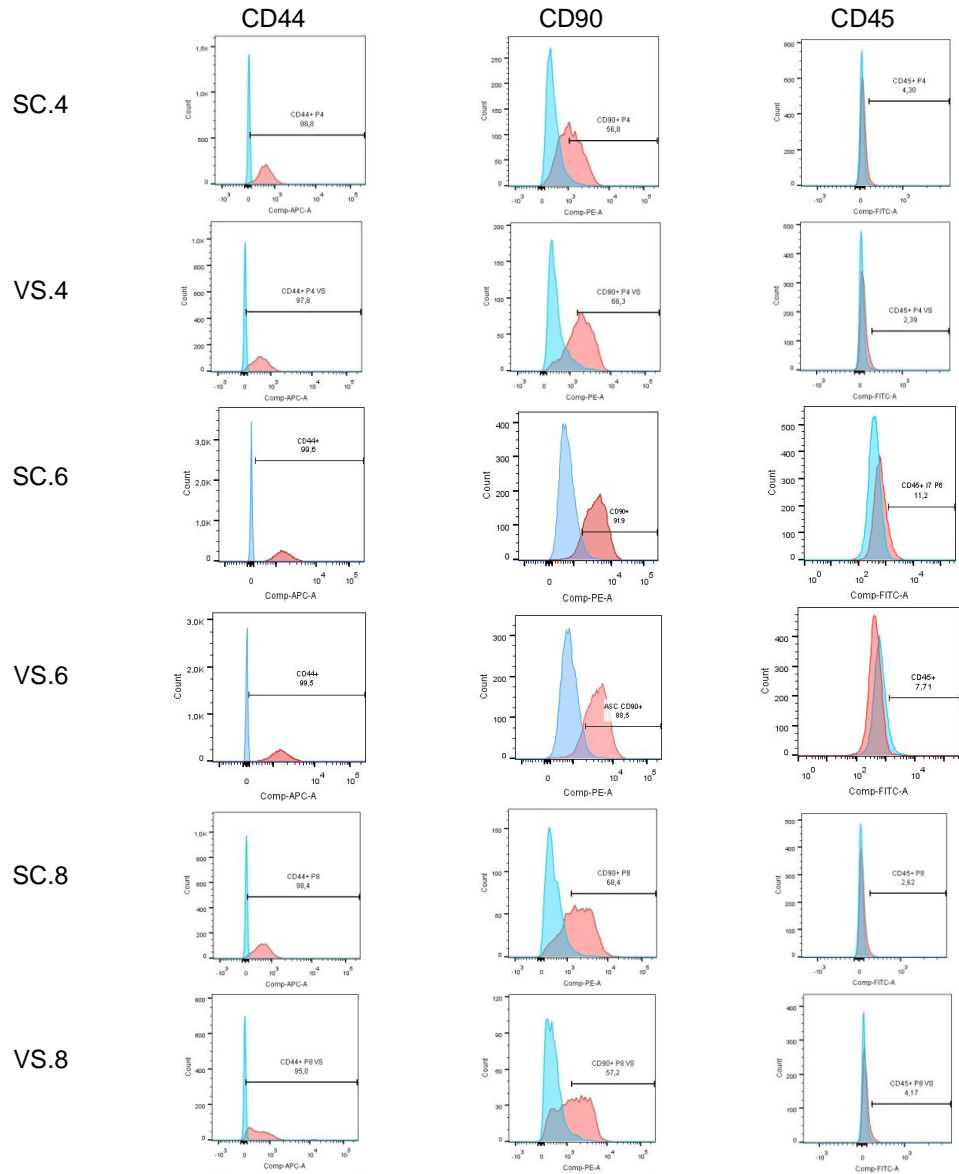


Figura 1. Citometría de flujo de las CMM-TA SC y VS P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> y P<sub>8</sub>. El histograma plots muestra células sin marcar (celeste), células marcadas (rojo). Las células marcadas con anti-CD44 conjugado con APC, anti-CD45 conjugado con FITC y anti-CD 90 conjugado con PE.

## Anexo IV

### Tridiferenciación *in vitro*

#### Diferenciación adipogénica

El local no influyo significativamente sobre el poder de diferenciación pero existe una tendencia de  $p=0,097$ . El pasaje si influye sobre el poder de diferenciación  $p=0,000$ .

Cuadro III. Porcentaje de diferenciación adipogénica

	Negativo	Positivo	No creció
SC	6,7	80	13,3
VS	20	26,7	53,3

Total 60 observaciones (30 por fuente) independientemente de la fuente.  
Valores totales: Negativo 13,3%; Positivo 53,3%; No creció 33,3%

#### Diferenciación condrogénica

El local no influyo significativamente sobre el poder de diferenciación pero existe una tendencia de  $p= 0,095$ .

Cuadro IV. Porcentaje de diferenciación condrogénica

	Negativo	Positivo	No creció
SC	41,7	41,7	16,6
VS	26,7	20	53,3

Total 54 observaciones (30 observaciones Vs y 24 observaciones Sc) independientemente de la fuente. Valores totales: Negativo 33,4%; Positivo 29,6%; No creció 37%.

#### Diferenciación osteogénica

El local no influyo significativamente sobre el poder de diferenciación pero existe una tendencia de  $p=0,091$ .

Cuadro V. Porcentaje de diferenciación osteogénica

	Negativo	Positivo	No creció
SC	30	56,7	13,3
VS	26,7	20	53,3

Total 60 observaciones (30 observaciones por fuente) independientemente de la fuente. Valores totales: Negativos 28,3%; Positivo 38,3% y No creció 33,4%.