



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**

“Caracterización de Células Estromales Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo en perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) para su probable uso terapéutico en Medicina Veterinaria”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ. Benjamín Macuil Rojas

Tutor principal: Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,
A.C.

Comité tutor: Dra. Ana María Salazar M.

Dr. Alejandro Villa Godoy

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Enero del 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Caracterización de Células Estromales Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo en perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) para su probable uso terapéutico en Medicina Veterinaria”

Este trabajo se realizó dentro del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Director de Tesis

Dr. Emmanuel Díaz

Asesor

Dr. Sergio Sandoval Ávila

Guadalajara, Jalisco 2017.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los siguientes apoyos:

Beca CONACyT para estudio de Maestría, No. 593832.

Beca CONACyT 2015-MZO2016 Mixta para movilidad nacional.

Proyecto FONDO CONACyT 2016 Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica. No. 271307.

CONACyT: Red Temática Células Troncales y Medicina Regenerativa

Apoyo de Práctica Escolar PAEP para realización de práctica en Guadalajara, Jalisco.

Agradezco especialmente a las siguientes personas, por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo: El Dr. Emmanuel Díaz, por su confianza, su constancia e insistencia. No lo hubiera logrado sin su ayuda. El Dr. Sergio Sandoval, por el tiempo invertido, el apoyo constante y todo el trabajo que dedicó para apoyarme. A la Dra. Clara Aguillón, por aguantar tanto telefonazo y papeleo, y siempre estar dispuesta a apoyarme. La Dra. Sara Caballero, por siempre orientarme y darme una idea más clara en todo tema de investigación desde licenciatura.

A ti, GGS. Por aguantarme. La mayor gratitud es para ti, en todo momento y en todo aspecto, a pesar de los malos momentos, el estrés y el exceso de esfuerzo de tu parte. Gracias. Siempre.

Mis padres, Norma y Benjamin, por el apoyo constante. Siempre sé que cuento con ustedes.

RESUMEN

La terapia de reemplazo con Células Troncales es una estrategia que cobra cada día mayor importancia a nivel experimental y de forma clínica, esta técnica consiste en introducir células caracterizadas y bien definidas por su potencial de diferenciación y especialización celular en tejidos dañados o enfermos para promover su reparación o completa sustitución. Éste potencial de regeneración, así como el de promoción de los mecanismos endógenos que presentan las Células Troncales las hace una alternativa fuerte y viable para corregir o mejorar el estatus de los pacientes con falla orgánica o tisular considerable, con un riesgo menor considerando otras alternativas terapéuticas invasivas.

Las Células Estromales Mesenquimales son un gran ejemplo clásico e importante de la potencialidad de la terapia celular. Se pueden encontrar de manera relativamente sencilla en tejidos adultos (principalmente en tejido adiposo y en la médula ósea) y en tejidos embrionarios (como la placenta y el cordón umbilical), su importancia radica en su fácil proliferación *in vitro* y en su capacidad para generar diversos fenotipos celulares bajo condiciones de inducción específicas; desde tipos celulares mesenquimales como condrocitos, osteoblastos y adipocitos, hasta células especializadas como las pancreáticas, hepatocitos, miocitos e incluso neuronas por citar algunas. En este estudio, se busca encontrar y caracterizar un nicho de células multipotenciales obtenidas a partir del tejido adiposo de cánidos clínicamente sanos para poder ser utilizadas potencialmente en terapias de reemplazo celular en esta especie a través de técnicas de inmunofluorescencia indirecta y RT-PCR para conocer el fenotipo y expresión génica de las células aisladas.

PALABRAS CLAVE: células troncales; células troncales mesenquimales; caracterización celular; aislamiento; proliferación celular; perro doméstico.

Abstract.

Stem Cell replacement therapy is a new strategy that is becoming important at an experimental and clinical level, this technique involves introducing well-defined cells in damaged or injured tissues to promote repair or complete replacement. This regeneration potential and the promotion of endogenous mechanisms that have the stem cells makes a strong and viable cell substitute to correct or improve the status of patients with significant organic or tissue failure, with a lower risk considering other invasive therapeutic alternatives.

Mesenchymal Stromal Cells are a classic and other important example of the potential of cell therapy. The mesenchymal stromal cells, can be found in adult tissues (adipose tissue and bone marrow) and in embryonic tissues (placenta and umbilical cord). Due to easy proliferation *in vitro* and in its ability to generate various cellular phenotypes under specific induction (chondrocytes, osteoblasts, adipocytes, pancreatic cells, liver cells, muscle cells and even neurons), they are considered an excellent model of study and possible therapy. This study looks to find and characterize a multipotent cells niche obtained from dogs adipose tissue to potentially be used in cell replacement therapies, by means of knowing the specific phenotype and genetic expression of the cultivated cells via indirect immunofluorescence and RT-PCR.

KEYWORDS: Stem cells; mesenchymal stem cells; cell characterization; isolation; cell proliferation, domestic dog.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	7
II. BASES TEÓRICAS.	8
II.1 Células troncales	8
II.2 Terapias de reemplazo celular.	12
II.3 Células Estromales Mesenquimales.	15
II.4 Plasticidad celular en células troncales.	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VI.1 Técnica quirúrgica y anestesia	23
VI.2 Toma de la muestra.....	24
VI.3 Transporte de la muestra	24
VI.4 Cultivo primario de células troncales mesenquimales	24
VI.5 Criopreservación	25
VI.6 Análisis de viabilidad celular por ensayo de MTT.....	26
VI.7 Inmunohistoquímica	27
VI.8 Extracción de RNA y RT-PCR.....	28
VI.9 Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS	31
VIII. DISCUSIÓN	41
IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
X. ABREVIATURAS	45
XI. ÍNDICE DE FIGURAS	47
XII. REFERENCIAS	48

I. INTRODUCCIÓN

Si hablamos de Terapias de reemplazo celular nos surge a la mente la posibilidad de substituir un tejido o tipo celular por otro con las mismas características, sin embargo, esta idea no es nueva ya que un tratamiento médico que ha sido utilizado desde hace muchos años han sido las transfusiones sanguíneas y el trasplante de médula ósea (Thomas, Lochte et al. 1959) por citar algunos ejemplos. Sin embargo, estos procedimientos han marcado sólo el inicio del desarrollo de la investigación robusta en éste tipo de tratamientos celulares, ya que desde el descubrimiento de los primeros precursores de tipo mesenquimal en los órganos hematopoyéticos aislados de ratón en 1976 (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976), este gran avance comenzó el estudio de dichas células con diferentes capacidades y fines científicos y tecnológicos así como de índole terapéutico. Por otra parte, actualmente se han realizado estudios de caracterización en líneas establecidas de Células Estromales Mesenquimales (CEM) obtenidas a partir de humanos (Pittenger, Mackay et al. 1999), y es por tanto la razón de buscar la caracterización de más líneas celulares procedentes de otras especies animales con el subsecuente beneficio de terapias potenciales y el uso de estas células como modelos experimentales *in vitro* de patologías o enfermedades degenerativas en los animales de alta estima, como lo son los animales de compañía principalmente el perro y el gato, ya que estas especies presentan la

mayoría de padecimientos de importancia médica veterinaria como son la diabetes, osteoartritis, entre otras.

II. Bases Teóricas

Células Troncales

Las Células Troncales (CT) o Stem Cells son aquellas células primitivas que permanecen en un estado indiferenciado, con una alta tasa de auto-renovación y con la capacidad más elevada de diferenciación a más de un linaje celular distinto a aquél del que fueron obtenidas (Taylor, Smith et al. 2007, Stewart and Stewart 2011, Egusa, Sonoyama et al. 2012, Sprio, Di Scipio et al. 2012). En los mamíferos, existen dos orígenes principales de células troncales: las CT embrionarias; derivadas principalmente de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo, y las CT del adulto; presentes en nichos celulares quiescentes localizados en diferentes tejidos y que pueden ser movilizadas en caso de ser requeridas tras una lesión o daño tisular (Eggenhofer, Luk et al. 2014). Asimismo, las CT se pueden clasificar acorde a su grado de potencialidad en: CT totipotenciales; encontradas sólo en el cigoto posterior a la fecundación y son capaces de comprometerse hacia cualquier linaje celular de un organismo completo, ya que a partir de esta célula se desarrollarán las tres capas embrionarias y también a los tejidos extraembrionarios que darán origen a la placenta. Por otra parte, continuando este esquema de potencialidad se encuentran las CT pluripotenciales, estas células presentan marcadores de los tres estratos embrionarios antes mencionados, provienen o son aisladas de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo, a estas células se les conoce como Células Troncales embrionarias (CTe) o ESC por sus siglas en inglés

(Embryonic Stem Cell) (Alison and Islam 2009). Las células multipotenciales u oligopotenciales también denominadas precursores celulares son un linaje específico de células capaces de diferenciarse y dividirse pero en forma más restrictiva en cuanto a su número y a sus características fenotípicas, generalmente pueden formar limitadas estirpes celulares pero de un mismo estrato. Finalmente las células unipotenciales o progenitores celulares son aquellas cuya capacidad es la más restringida de todas estas, permanecen como sustituto o reemplazo de una sola línea celular madura, generalmente se encuentran en el organismo adulto (Wagers and Weissman 2004, Fortier 2005)(Fig. 1).

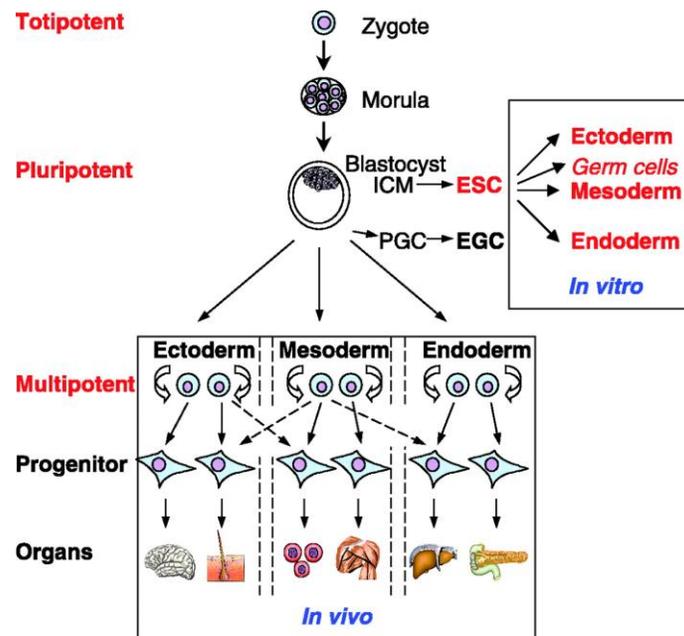


Figura 1. Fuente de obtención y diferenciación celular. En el esquema se puede observar los distintos linajes y compromiso de las CT y su clasificación acorde a su potencialidad de generar diversos tejidos.

El término CT fue acuñado en el año de 1868 por el biólogo alemán Ernst Haeckel, para describir el organismo unicelular ancestral del cual teorizaba que todos los organismos pluricelulares evolucionaron, y más tarde utilizó este mismo término para referirse al ovocito fertilizado, que da origen a todas las células del organismo (Maehle 2011). Más adelante, Edmund B. Wilson popularizó el término

stem cell (célula troncal) con una revisión en idioma inglés del trabajo de Haeckel en su libro “The Cell in Development and Inheritance” (Ramalho-Santos and Willenbring 2007). Dicho trabajo sirvió de inspiración para una gran cantidad de investigadores de la época, y debido a su gran influencia, se le considera en términos generales como el inventor del término “célula troncal” (Shostak 2006).

Más tarde, con la demostración de la existencia de las células troncales hematopoyéticas, se estableció el prototipo de célula troncal: capaces de proliferar de manera casi indefinida (auto-renovación) y la capacidad de dar origen a linajes especializados (potencial de diferenciación). Con base en estos parámetros, podemos entonces localizar células con características de troncalidad en una gran variedad de tejidos, desde la piel hasta el sistema nervioso central (Mayani 2003). Con los experimentos de McCulloch y Till en 1960, en donde inyectaron células provenientes de médula ósea en ratones irradiados y se observó el crecimiento de colonias de células de diferentes linajes hemáticos en el bazo, se confirmaron éstas propiedades, que hasta hoy en día son objeto de intensa investigación y búsqueda de alternativas terapéuticas (McCulloch and Till 1960).

En el organismo adulto, se ha encontrado la existencia de diversas fuentes de células troncales en diferentes órganos y tejidos, entre las cuales encontramos las células troncales hematopoyéticas (Rector, Liu et al. 2013, Shen, Zheng et al. 2015), células troncales mamarias (Clarke 2005, Dontu and Wicha 2005), células troncales intestinales (Wang, Scoville et al. 2013), células troncales neurales (Mothe and Tator 2015), células troncales olfatorias (Feron, Perry et al. 2013, Ohnishi, Iwatsuki et al. 2015), células troncales de cresta neural (Hauser, Widera et al. 2012, Pelaez, Huang et al. 2013), células troncales germinales (Altman, Yango et al. 2014, Dunlop, Telfer et al. 2014), células troncales endoteliales (Xu, Lee et al. 2014), y células troncales (estromales) mesenquimales (Carbone, Valente et al. 2016, Li, Ghazanfari et al. 2016). Éstas últimas son de las más investigadas, debido a su facilidad de obtención, la diversidad de tejidos a partir de los cuales se pueden extraer, y su potencial uso en distintas líneas de

investigación en medicina regenerativa.

Hace más de 50 años, a partir de los experimentos de Friedenstein et al (Friedenstein, Ivanov-Smolenski et al. 1978) con CT hematopoyéticas, se descubrió la existencia de otro tipo celular que daba origen a células de linaje distinto, siendo en este caso evidente al descubrirse colonias con características osteoblásticas. En 1991, Caplan introdujo el término “células troncales mesenquimales” (MSCs, por sus siglas en inglés) para referirse a las células del mesodermo a partir de las cuales se generan los tejidos óseo, cartilaginoso, adiposo, tendinoso, ligamentoso, muscular, médula ósea y la piel (Caplan 1991). Las células estromales mesenquimales, son una población heterogénea con capacidades variables de auto-renovación y diferenciación, sin marcadores específicos de superficie que las caractericen (Salem and Thiernemann 2010). Debido a esto, las CEM humanas y de mamíferos se definen por su capacidad de adherirse al plástico en cultivo, expresión de CD73, CD90 y CD105, ausencia de CD34, CD45, CD14 y HLA-DR, y la diferenciación hacia adipocitos, condrocitos y osteocitos bajo condiciones específicas de inducción (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

En el organismo adulto, las CEM se encuentran dentro de sitios específicos conocidos como nichos. Se denomina nicho a un microambiente tisular localizado capaz de albergar y mantener a una o más células troncales, preservando sus características. Para ser considerado como tal, un nicho debe ser capaz de captar y mantener a otras células troncales cuando las anteriores han sufrido daño o han sido utilizadas; demostrando entonces que ésta propiedad es localizada y no una característica general del tejido (Hoggatt and Scadden 2012). La existencia de sitios tisulares con características de nicho que albergan CEM en el modelo murino se ha demostrado en prácticamente todos los órganos (Nilsson, Johnston et al. 2001). Existe evidencia de un origen perivascular de las CEM, por lo que los órganos con flujo sanguíneo tendrán CEM asociadas a las paredes vasculares

(Putnam 2014, Oh and Nor 2015). Históricamente, el sitio más común para la obtención de células estromales mesenquimales ha sido la médula ósea, sin embargo, el proceso de obtención puede ser doloroso e invasivo, además de conseguir una baja frecuencia de obtención de dichas células (0.001-0.01%, y decrece con la edad) (Pittenger, Mackay et al. 1999). Como alternativa, las CEM se han aislado de múltiples tejidos en muchas especies, tales como tejido adiposo, cartilago articular, tejido dental, endometrio, piel, órganos y tejidos perinatales (líquido amniótico, membrana amniótica, placenta, gelatina de Wharton, tejido de cordón umbilical, sangre de cordón umbilical) (Wan, Cheng et al. 2008, Billing, Ben Hamidane et al. 2016, Camilleri, Gustafson et al. 2016), e incluso cerebro (Hou, Cao et al. 2003).

Terapia de reemplazo celular

El objetivo principal del conocimiento de la Biología y Fisiología de las CT es la búsqueda de su aplicación exitosa en terapias de reemplazo celular. Éste tipo de tratamientos, conocidos en conjunto como Citoterapia, tiene su origen a principios Siglo XX con la colaboración de diferentes científicos cuyo principal objetivo era la prolongación de la vida humana individual y el revitalizamiento de las personas a través de técnicas radicales, entre las que destacan los estudios de aloinjertos y xenoinjertos en humanos de Serge Voronoff (1866-1951), los orígenes de la ciencia de Ingeniería de Tejidos y preservación de órganos y tejidos en ambientes extracorpóreos de Alexis Carrel (1873-1944), y la *Zellular-therapie* de Paul Niehans (1882-1971), quien inyectaba a sus pacientes con células obtenidas de órganos específicos de animales, dependiendo de la patología a tratar, e incluso células humanas obtenidas a partir de productos abortados (Haubold 1954, Augier, Salf et al. 1996, Lefrere and Berche 2010).

Hoy en día con el avance de las Ciencias Médicas y Biológicas, estas técnicas de origen rudimentario se han refinado a muy altos niveles. Comenzando desde los estudios de trasplante de médula ósea, y por consiguiente de progenitores celulares, en 1939 se realizó el tratamiento de anemia aplásica con

transfusiones sanguíneas e inyección intravenosa de médula ósea (Munoz, Shah et al. 2014). Para el año de 1957, E. Donall Thomas. realizó los primeros trasplantes alogénicos de médula ósea en pacientes en tratamiento por leucemia (Thomas, Lochte et al. 1957). A partir de éstos primeros resultados experimentales, la citoterapia ha avanzado y se ha diversificado hasta su estado actual, en el que las técnicas se han refinado y el conocimiento de varias patologías susceptibles a éste tratamiento se ha profundizado. Se puede clasificar, en términos generales, a la citoterapia dependiendo del tipo celular potencialmente utilizable: trasplante de precursores hematopoyéticos, citoterapia alogénica (Kroger, Giorgino et al. 2015, Tsushima, Sakurai et al. 2015), terapia con precursores neurales (Bonnamain, Neveu et al. 2012, Tincer, Mashkaryan et al. 2016), terapia con células embrionarias y pluripotentes inducidas (Leeper, Hunter et al. 2010, Ghaedi and Niklason 2016, Gill, Hung et al. 2016), y terapia con CEM (Zaher, Harkness et al. 2014, You, Namgoong et al. 2015).

En México, para trabajar con células troncales, se requiere una autorización sanitaria y el centro debe contar con un Comité interno de trasplantes. Está prohibido comerciar con células de cualquier tipo y se requiere permiso especial para sacarlas del territorio nacional (Ley General de Salud) (Hurtado 1984). No existen sanciones para la experimentación con células embrionarias, sin embargo, en el Distrito Federal está prohibido utilizar gametos para propósitos no autorizados por los donantes y no está autorizada la creación de blastocistos para fines distintos a la procreación (Codigo Penal DF) (Obrador 2002). Debido a la falta de una legislación clara al respecto, se ha frenado hasta cierto punto el desarrollo del estudio de células troncales. A pesar de esto, existen varias instituciones públicas y privadas que se dedican a la investigación con CT de distintos orígenes, y existen reportes de resultados de la utilización de terapia celular como: la utilización de células troncales embrionarias en un modelo murino de lesiones traumáticas oculares, observándose disminución de la inflamación y recuperación de la integridad histológica (Vazquez-Zapien, Rojas-Lopez et al. 2014). Por otro lado, se ha demostrado que el trasplante de células troncales

mesenquimales en una avulsión de la raíz espinal en un modelo murino tienen efecto neuroprotector y de reinervación después de la avulsión (Torres-Espin, Corona-Quintanilla et al. 2013).

El desarrollo de la citoterapia aplicada en Medicina Veterinaria ha seguido un curso más libre y legalmente menos restringido, sin embargo sólo existen algunos reportes de casos clínicos de distinta índole y en varias especies alrededor del mundo. En la actualidad, la investigación para el tratamiento y cura de distintos padecimientos degenerativos en Medicina Veterinaria no se centra únicamente en la utilización de fármacos ya que éstos por lo regular son únicamente útiles para atenuar o disminuir algunos de los signos de la enfermedad y en la mayoría de los casos tienen el inconveniente de presentar efectos colaterales indeseables, y se debería centrar en la búsqueda de alternativas, siendo un buen ejemplo la citoterapia. Acorde con estos antecedentes, resulta de gran relevancia en Medicina Veterinaria y particularmente la clínica de pequeñas especies y de equinos utilizar todas las herramientas necesarias para la investigación y uso potencial de las CT ya que en todas estas especies se presentan padecimientos de importancia médica, tales como osteoartritis, tendinitis, diabetes y procesos neurodegenerativos (Fortier and Travis 2011) ,que cada vez se presentan con mayor frecuencia en la práctica clínica y la mayoría de estas enfermedades permanece sin un tratamiento definitivo o sin el restablecimiento de las funciones biológicas de los tejidos lesionados.

La terapia de reemplazo con CT en Medicina Veterinaria es una estrategia que cobra cada día mayor importancia a nivel experimental y de forma clínica, esta técnica consiste en introducir células caracterizadas y bien definidas por su potencial de diferenciación y especialización celular en tejidos dañados o enfermos para promover su reparación o completa substitución. Éste potencial de regeneración, así como el de promoción de los mecanismos endógenos que presentan las CT las hace una alternativa fuerte y viable para corregir o mejorar el estatus de los pacientes con falla orgánica o tisular considerable, con un riesgo

menor considerando otras alternativas terapéuticas invasivas (Parekkadan and Milwid 2010).

Células Estromales Mesenquimales (MSCs)

Las Células Estromales Mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) tienen su origen embrionario en el mesodermo, se ha demostrado que estas células pueden ser aisladas del estroma de algunos órganos en el adulto o en el desarrollo como la médula ósea, el músculo estriado esquelético, el tejido adiposo, el tendón, la sinovia y el periostio (Fortier and Travis 2011, Boxall and Jones 2012, Burk, Ribitsch et al. 2013). Sin embargo, no todas poseen una capacidad alta de diferenciación celular cuando son expandidas en cultivo hacia otros linajes celulares (Mundra, Gerling et al. 2013) y presentan una baja tasa de autorenovación y proliferación (Jones and Wagers 2008, Penny, Harris et al. 2012), por lo que resulta de vital interés encontrar una fuente celular de CEM que cumpla estas características (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

De acuerdo a lo estipulado por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular [en inglés International Society for Cellular Therapy (ISCT)], las características mínimas que deben de tener las CEM son (Horwitz, Le Blanc et al. 2005):

- 1) Capacidad de adherirse a la superficie de cultivo.
- 2) Presencia de antígenos específicos de superficie. En CEM de humano se propone al menos Sca1, Sto1, CD105, CD73 y CD90, esto con la finalidad de identificar qué células son realmente precursoras y con ello incrementar la eficiencia de proliferación.
- 3) Capacidad de diferenciarse en los tres linajes distintos, osteoblastos (BAP, hidroxiapatita y osteocalcina), condrocitos (CD44, agrecano, colágena tipo II y IV) y adipocitos (ALBP, FAT, leptina).

Las CEM, como ya se mencionó previamente, son un gran ejemplo clásico e importante de la potencialidad de la terapia celular. Se pueden encontrar de manera relativamente sencilla en tejidos adultos (principalmente en tejido adiposo y en la médula ósea) y en tejidos embrionarios (como la placenta y el cordón umbilical), su importancia radica en su fácil proliferación *in vitro* y en su capacidad para generar diversos fenotipos celulares bajo condiciones de inducción específicas; desde tipos celulares mesenquimales como condrocitos, osteoblastos y adipocitos, hasta células especializadas como las pancreáticas, hepatocitos, miocitos e incluso neuronas por citar algunas (Parekkadan and Milwid 2010).

En Medicina Veterinaria, existe un gran interés por el desarrollo de nuevas técnicas que apoyen o reemplacen los métodos terapéuticos actuales, y la investigación y uso clínico de las CEM no es una excepción. Desde el uso de animales como modelo de enfermedades que afectan al humano hasta el tratamiento de enfermedades propias de cada especie, existen diversas líneas de investigación en las cuales se busca la aplicación de las CEM y otros tipos celulares como base de una terapia regenerativa. Es de especial importancia mencionar el papel del perro (*Canis lupus familiaris*) y del equino (*Equus ferus caballus*) dentro del desarrollo de la Medicina Veterinaria, debido a su estado como animales de alta estima y de compañía, y la gama de tratamientos potenciales derivada del estudio de las células troncales que se pueden aplicar a éstas especies (Kisiel, McDuffee et al. 2012, Burk, Berner et al. 2016, Gonzalez-Fernandez, Perez-Castrillo et al. 2016, Khojasteh, Fahimipour et al. 2016, Kim, Song et al. 2016).

En el caso del perro, diversos estudios se han llevado a cabo, desde caracterización básica de las células (Vieira, Brandalise et al. 2010, Spencer and Lopez 2011) hasta estudios clínicos (Reich, Raabe et al. 2012, Filioli Uranio, Dell'Aquila et al. 2014, Kim, Lee et al. 2016), con resultados variables pero de importancia para el desarrollo del campo de la medicina regenerativa veterinaria.

Las fuentes celulares más estudiadas en la especie son las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSCs, por sus siglas en inglés), y las derivadas de médula ósea (BMMSCs, por sus siglas en inglés). En estudios comparativos, se han encontrado similitudes en expresión de mRNA para los genes de pluripotencia Oct3/4 y Sox2, y niveles más elevados de Nanog en ADMSCs (Takemitsu, Zhao et al. 2012). De acuerdo con los hallazgos de Vieira et al (Vieira, Brandalise et al. 2010), las ADMSCs expresan, a partir del cuarto pasaje, CD29, CD44 y CD90, y son negativas a CD45; sin embargo, un 10% fueron positivas a CD34. Por otra lado se ha documentado, que las ADMSCs derivadas de muestras de grasa subcutánea tuvieron un mayor rendimiento celular y llegaron a confluencia en cultivo de manera significativamente más rápida, que las muestras de grasa abdominal (Reich, Raabe et al. 2012). De igual manera demostraron la expresión de los marcadores de pluripotencia Oct4, Nanog y Sox2. En otro estudio, se caracterizó a las células por medio de citometría de flujo evaluando la expresión de proteínas de superficie, y se observó que, tanto de tejido adiposo como de médula ósea, fueron CD90+, CD44+, MHC I+, CD14-, CD29-, CD34-, MHC II-. Utilizando RT-PCR, se caracterizó aún más la expresión celular y se obtuvo como resultado células CD105+, CD73+, CD14+, CD29+, MHC II+, CD45- a nivel mRNA. Éste hallazgo de CD14, CD29 y MHC II demostró que los resultados de los estudios transcripcionales no siempre se traducen como proteínas (Screven, Kenyon et al. 2014).

El uso de ADMSCs representa grandes ventajas en comparación con otras fuentes de tejido, principalmente por su facilidad de obtención y las grandes cantidades de tejido que pueden extraerse de manera segura, menos invasiva y dolorosa para el paciente. Adicionalmente, las células derivadas de tejido adiposo muestran una buena respuesta a la criopreservación en una solución de 10% con sulfóxido de dimetilo (DMSO) y 90% de suero fetal bovino, obteniéndose un buen porcentaje de viabilidad y de conservación de marcadores de superficie (Renzi, Lombardo et al. 2012, Dariolli, Bassaneze et al. 2013, Davies, Smith et al. 2014). En el caso específico de ADMSCs de perro, se han mantenido en criopreservación

con la anterior fórmula por hasta 12 meses sin cambios considerables en su expresión de marcadores o potencial de diferenciación, pero sí se observaron diferencias considerables en su potencial de proliferación. Se encontró, además, una reducción en la actividad de telomerasa, sin que esto afectara considerablemente el potencial de éstas células *in vitro* (Martinello, Bronzini et al. 2011).

Plasticidad de las células troncales

En el adulto se lleva a cabo el proceso de reemplazo celular y la regeneración de tejidos, para mantener la homeostasis, por un tiempo se pensó que las células troncales adultas (CTA) tenían una capacidad de autorrenovación y diferenciación restringidas, de manera que las CTA residentes en un tejido solo generan los tipos de células maduras correspondientes a su tejido de origen y no cruzan los límites del tejido para generar diferentes linajes celulares, en comparación con las CT derivadas de tejidos embrionarios (Clarke and Frisen 2001, Wagers and Weissman 2004). Sin embargo, experimentos recientes han demostrado que algunas de estas CTA pueden diferenciarse a tipos celulares diferentes al de su origen embrionario, bajo ciertas circunstancias las células sufren una conversión de una célula de un linaje definido a una célula de un linaje totalmente diferente, con la pérdida concomitante de los marcadores del tejido en función del tipo celular original y la adquisición de marcadores y la función del tipo de célula transdiferenciada específica (Blau, Brazelton et al. 2001). Esta “habilidad biológica”, se fundamenta en la capacidad que tienen de alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan, y se le conoce en la actualidad como “fenómeno de plasticidad” (Wagers and Weissman 2004). Se ha confirmado la diferenciación de células troncales hematopoyéticas (CTH) hacia músculo esquelético (Stromberg, Jansson et al. 2013), músculo cardiaco (Carvalho, Verma et al. 2015), tejido endotelial (Jackson, Majka et al. 2001) y tejido neuronal (Lang, Nishimoto et al. 2016).

En este estudio, se busca caracterizar un nicho de células multipotenciales

en el tejido adiposo subcutáneo de caninos para su potencial uso en terapias regenerativas de esta especie y lo más importante que represente un método poco invasivo y de fácil procuración y disposición. Los resultados obtenidos de esta investigación nos permitirán elucidar en el establecimiento de algunos de los criterios para su posterior uso terapéutico en la Medicina Veterinaria ya que podrían ser usadas en tratamientos alogénicos criopreservando y obteniendo un banco de células para su pronta disponibilidad.

III. JUSTIFICACIÓN

La caracterización y manipulación *in vitro* de las células mesenquimales aisladas del tejido adiposo en *Canis lupus familiaris*, permitirá establecer nuevas líneas de investigación en Medicina Veterinaria, favoreciendo el estudio de nuevas alternativas de tratamiento y/o desarrollo de nuevas terapéuticas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

Cultivar, aislar y caracterizar las células mesenquimales de tejido adiposo de *Canis lupus familiaris*.

Objetivos Específicos:

- a) Aislar muestras de tejido adiposo.
- b) Obtener células estromales a partir de tejido adiposo de perro.
- c) Cultivar y hacer proliferar a las células estromales.
- d) Caracterizar las células estromales.
- e) Determinar expresión de marcadores de superficie celular mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- f) Criopreservar y verificar la factibilidad para establecimiento de un banco celular.
- g) Determinación de la expresión de genes relacionados con pluripotencia (NANOG, POU y SRY).

V. HIPÓTESIS

Existen células estromales mesenquimales en tejido adiposo de la especie *Canis lupus familiaris*, y pueden ser aisladas con la finalidad de obtener un banco celular caracterizado para su futura aplicación en Medicina Veterinaria.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Tipo de estudio: Estudio experimental.

1) Muestra animal.

Se utilizaron tres perros adultos, machos, de 2.5, 4 y 6 años de edad (32.5, 6.3, 11.0 kg respectivamente) fueron seleccionados como una muestra representativa (80% confiabilidad). Los individuos fueron intervenidos quirúrgicamente por el médico veterinario responsable de la clínica, con la finalidad de obtener una muestra de tejido graso de aproximadamente 5 gramos, previo consentimiento informado del propietario. Antes de la intervención, a todos los animales seleccionados se les midieron las constantes fisiológicas de acuerdo a las políticas internas del establecimiento donde se realizó la cirugía, con la finalidad de constatar el estado general de salud.

1.1) Procedimiento Anestésico Local.

Antes de realizar el procedimiento quirúrgico se administró por vía oral acepromacina (Calmivet, Vétoquinol de México) únicamente como tranquilizante general (1-3 mg/kg por vía oral, no menos de 60 min antes del procedimiento de obtención de tejido adiposo, Hall, L.W and K.W. Clarke 1983). La anestesia local, con 0.5 ml de lidocaína al 2% más epinefrina (PISA, México), fue realizada

mediante infiltración subcutánea en región dorsal. Posterior a esto, se procedió a la desinfección, depilación y embrocado del sitio para tomar la muestra de tejido adiposo.

2) Toma de muestra.

La obtención de tejido adiposo se realizó a partir de tejido subcutáneo del dorso en perro (*Canis lupus familiaris*) (Fig. 2). Se tomaron aproximadamente 5 g de tejido adiposo de la región dorsal interescapular, con incisión regional, teniendo mucho cuidado de no lastimar estructuras circundantes o tejido muscular. Una vez recolectada la muestra esta fue procesada para su cultivo y posterior proliferación celular.

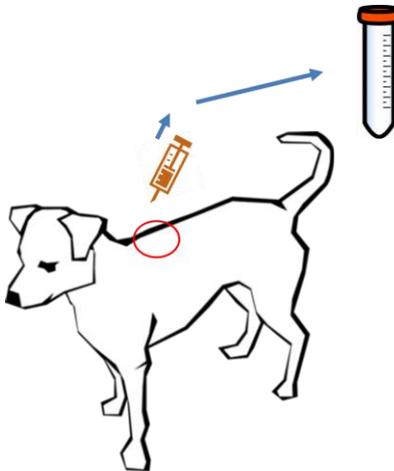


Figura 2. Esquema del sitio de la toma de muestra. Se observa el sitio anatómico dorsal de la toma del tejido graso subcutáneo, para su posterior procesamiento.

3) Transporte de la muestra.

Se recolectó de forma individual mediante técnica quirúrgica la muestra de tejido graso y se introdujo en un tubo cónico estéril conteniendo medio de cultivo DMEM fresco (Gibco, USA) y suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) (By Products, México). Durante todo el transporte se mantuvo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

4) Cultivo primario de células mesenquimales.

Se partió de una muestra de tejido adiposo (mínimo 3 gr) la cual se transportó en medio DMEM y hielo (4°C). Posteriormente, dentro de una campana de flujo laminar la muestra se colocó en una caja Petri de 30 mm estéril y se lavó por 2 ocasiones con PBS estéril. El tejido fue fragmentado en pequeños trozos con la ayuda de un bisturí y se traspasó a un tubo falcon de 50 ml. Se llevó a cabo la disgregación del tejido con 5 ml de colagenasa tipo II (Invitrogen, USA) al 0.2% en PBS y se incubó durante 45 min a 37°C (SERIES 8000 DH CO₂ Incubator, Thermo Scientific). A continuación, se agregó un volumen igual de medio de cultivo DMEM con 10% de SFB y se centrifugó (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Ger.) a 1500 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el botón celular se resuspendió en 2 ml de medio DMEM KO (Gibco, USA) suplementado con 10% de SFB, 2mM L-Glutamina (Thermo Fisher Scientific, USA) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, USA). Enseguida se realizó la prueba de viabilidad celular (Azul tripano [Sigma-Aldrich, USA]) y se evaluó la densidad de siembra con la ayuda de un hematocitometro. Finalmente se sembraron las células en un frasco de cultivo (25 cm²) y se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Una vez adheridas las células de grasa al fondo del frasco de cultivo celular, se eliminaron todas las células no adherentes, tales como eritrocitos, mediante el cambio de medio cada tercer día. El pasaje celular se realizó después del 80% de confluencia. Después de tres pasajes se mantuvo su expansión hasta llegar a una confluencia cercana al 80-85%. Una vez alcanzada esta densidad celular, las células obtenidas fueron congeladas en crioviales de 1.5 ml conteniendo una solución de 10% dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) y 90% SFB. Se disminuyó la temperatura de los viales gradualmente hasta -80°C, y se mantuvieron en congelación hasta su posterior uso.

5) Crio-preservación.

La crio-preservación fue realizada empleando medio de crio-preservación que contiene básicamente medio de cultivo celular suplementado con 20% de SFB además de contener 5 al 10% del crio-preservante DMSO. Como a continuación se enumera:

1. Se preparó el medio de crio-preservación a 4°C
2. Se retiró de la incubadora la botella con las células y se colocó en la campana de flujo laminar.
3. Se realizó el lavado con PBS (1x) o solución Hanks estéril dejándolo correr por un lado de la botella y homogenizarlo posteriormente en la superficie en donde se encuentran adheridas las células.
4. Se realizó el desprendimiento celular con TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, USA) o con ayuda de scraper en los casos donde el agente enzimático no desprendió las células.
5. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos.
6. Se resuspendió la pastilla con medio celular fresco y se realizó el conteo celular.
7. Finalmente se tomó la cantidad necesaria de la suspensión celular para obtener un millón de células.
8. Se adicionó un ml de medio celular de crio-preservación frío para que no resultase tóxico para las células.
9. Se colocaron los viales dentro de la cámara de isopropanol y se almacenaron a -80°C durante 24 h.
10. Finalmente se transfirieron los viales de la cámara de isopropanol al tanque de nitrógeno líquido para su posterior uso.

6) Análisis de viabilidad celular por ensayo de MTT:

Para la determinación *in vitro* de las MSCs viables se utilizó el ensayo de MTT, para lo cual se utilizó un Kit (SIGMA No. de Cat. TOX1-1kT), el cual mide la actividad de las células vivas a través de las deshidrogenasas mitocondriales. Las deshidrogenasas mitocondriales de células viables se unen a un anillo de

tetrazolio, produciendo cristales púrpuras de formazán. Los cristales se disuelven en DMSO y la solución púrpura resultante se midió en un espectrofotómetro (xMark, Bio-Rad, USA) a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente, se midió la absorbancia de fondo de la placa de 96 pocillos a 655 nm y se restó de la medición de 595 nm para eliminar así el error producido y finalmente calcular la viabilidad celular de cada muestra, pudiendo así comparar la absorbancia de las diferentes condiciones (50 μ M y 100 μ M) con la del control negativo, el cual corresponde a las células sin tratamiento.

Viabilidad celular:

Se determinaron las células viables mediante una cinética con la prueba MTT comparando las diferentes concentraciones durante los días 3, 7, 9 y 11 de proliferación. La prueba fue realizada en placas de 24 pozos con triplicados y con 1000 células/pozo. Los resultados de la prueba fueron analizados por un espectrofotómetro de micro placas (xMark, Bio-Rad, USA) a 595nm y se compararon resultados.

7) Inmunofluorescencia Indirecta.

A partir de un cultivo entre un 80-90% de confluencia las células fueron desprendidas con TrypLE Express, enseguida se realizó el conteo de células en hematocitometro y Azul tripano, se sembraron 20,000 células en cámaras Labteck chamber slides 8 well (Thermo Fisher Scientific, USA) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA) durante 30 min a T.A., luego se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 0.05% por 30 min a T.A., enseguida se procedió a bloquear los sitios inespecíficos con suero normal de cabra (SNC) al 10% en PBS por 1 h a T.A., seguidamente se lavaron las células una vez con PBS por 5 min. Posteriormente, se incubaron a 4°C toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios: mouse anti-CD105 (Abcam, UK), mouse anti-CD90 (Abcam,

UK), mouse anti-CD44 (Abcam, UK), rabbit anti-CD45 (Abcam, UK) y rabbit anti-Integrina beta 1 (Abcam, UK) a una dilución 1:200. Después se lavaron las células por 3 ocasiones con SNC al 1% por periodos de 5 min. Seguidamente, las muestras fueron incubadas por 2 h a T.A. y en oscuridad con los siguientes anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 Goat Antimouse IgG (Molecular Probes, USA) y Alexa Fluor 594 Goat Antirabbit IgG (Molecular Probes, USA) a una dilución 1:1000. Luego, se lavaron con PBS por tres ocasiones de 5 min cada una, se dejaron secar y a continuación se montaron con un cubreobjetos con Fluoromont (Sigma-Aldrich, USA) y DAPI (Sigma-Aldrich, USA), enseguida se dejaron polimerizar por 45 min a T.A. en oscuridad. Finalmente, las muestras se observaron bajo el sistema confocal TCS SPE RGVB, microscopio DM5500B-CS y el software de captura LASX de Leica.

Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
CD105 [1:200]	Alexa Fluor anti-mouse 488 [1:1000]
CD90 [1:200]	Alexa Fluor anti-mouse 488 [1:1000]
CD45 [1:200]	Alexa Fluor anti-rabbit 594 [1:1000]
CD44 [1:200]	Alexa Fluor anti-mouse 488 [1:1000]
Anti-Integrina beta 1 [1:200]	Alexa Fluor anti-rabbit 594 [1:1000]

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios y el factor de dilución utilizada durante la etapa de caracterización.

8) Extracción de RNA, Retro-transcripción (RT-PCR) y PCR en tiempo real (RT-qPCR).

La extracción de RNA se realizó utilizando TRIzol reagent (Invitrogen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA aislado se cuantificó a 260/280 nm (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA). El cDNA fue sintetizado (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) mediante una reacción transcriptasa reversa (SuperScript III First-Strand, Invitrogen, USA) usando 250 ng de RNA total. Posteriormente, se realizó una RT-PCR cuantitativa relativa (QuantStudio 3, Applied Biosystems, USA), los primers específicos

utilizados fueron OCT/P0U5F1, SOX2 y NANOG (TaqMan-FAM, Applied Biosystems, USA), ver tabla 2. Los niveles de expresión de OCT/P0U5F1, SOX2 y NANOG se normalizaron al nivel de expresión del gen constitutivo 18S. Se usaron 5 μ l de cDNA en un volumen final de 12 μ l, ver tabla 3. Se estandarizaron las condiciones de amplificación de la siguiente manera: Una incubación inicial de 2 min a 50°C, 95 °C por 10 min, 45 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 60 seg y 40°C por 30 seg.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Primer secuencia	Tamaño del amplicón
NANOG	NANOG homeobox	For CCTGCATCCTTGCCAATGTC Rev TCCGGGCTGTCCTGAGTAAG	101 pb
OCT4/POU5F1	POU class 5 homeobox 1	For AGAAGGATGTGGTCCGAGTG Rev CCCAGCAGCCTCAAATCCT	77 pb
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	For AACCCCAAGATGCACAACCTC Rev CGGGGCCGGTATTTATAATC	91 pb

Tabla 2. Primers empleados en el ensayo de RT-PCR para la expresión génica del mRNA de pluripotencia.

Reactivo	Volumen
Master Mix PCR 2X	6 μ l
Sonda/Primer 20X	0.6 μ l
Cdna	5 μ l
Agua libre de nucleasas	1.6 μ l
Total	12 μ l

Tabla 3. Reactivos y volumen por cada reacción de 12 μ l para el ensayo de RT-qPCR.

9) Análisis Estadístico.

Los resultados son expresados por la media \pm el error estándar de la media.

El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA seguida de una prueba poshoc T3 de Dunnet, con la ayuda del software Graph Pad v5.0, para el cálculo de los valores de probabilidad. Se espera que más del 50% de las células obtenidas de las muestras de tejido adiposo de perro donadas de una clínica veterinaria presentan los marcadores típicos de células mesenquimales, de ahí que con una $n=3$, se obtiene la probabilidad de más del 85% de que al menos una presente células con los marcadores adecuados. Calculo del tamaño de la muestra: $(0.49) (0.49) (0.49) = (0.49)^3 = 0.117$. $p = 1.0 - 0.117 = 0.883$.

VII. RESULTADOS

Evaluación clínica de los sujetos de estudio.

Para determinar el correcto estado de salud tres perros fueron seleccionados aleatoriamente para la toma de una pequeña muestra de tejido adiposo de la parte dorsal del cuerpo, a nivel preescapular. Se obtuvieron las constantes fisiológicas y fueron seleccionados aquellos perros sin antecedentes o padecimientos clínicos previos.

Obtención cultivo primario.

Para la correcta caracterización de las células obtenidas del tejido adiposo de perros fue necesario su cultivo y expansión *in vitro*, para lo cual se desarrolló el siguiente protocolo previamente descrito y ejemplificado en Fig. 3. Se obtuvieron 5 g de grasa subcutánea de perros y se transportaron en medio celular especial para transporte, posteriormente una vez en el laboratorio se realizaron lavados con PBS 1x y se procedió a la fragmentación mecánica y posteriormente enzimática del tejido. Una vez realizado este procedimiento las células fueron sembradas en cajas de cultivo celular e incubadas a 37° C con una mezcla 95%-5% (O₂-CO₂ respectivamente). Al tercer día de sembrado las células presentan una morfología tipo fibroblastoide de aproximadamente 50 – 100 µm de longitud por célula, siendo comparable con la barra de escala tomada en la microfotografía y con la característica de ser adherentes a la superficie de la caja de cultivo, al igual que las MSCs obtenidas de una línea celular humana utilizada como control

(Fig. 4).



Figura 3. Esquema representativo del aislamiento de células troncales mesenquimales a partir de una muestra de tejido adiposo canino.

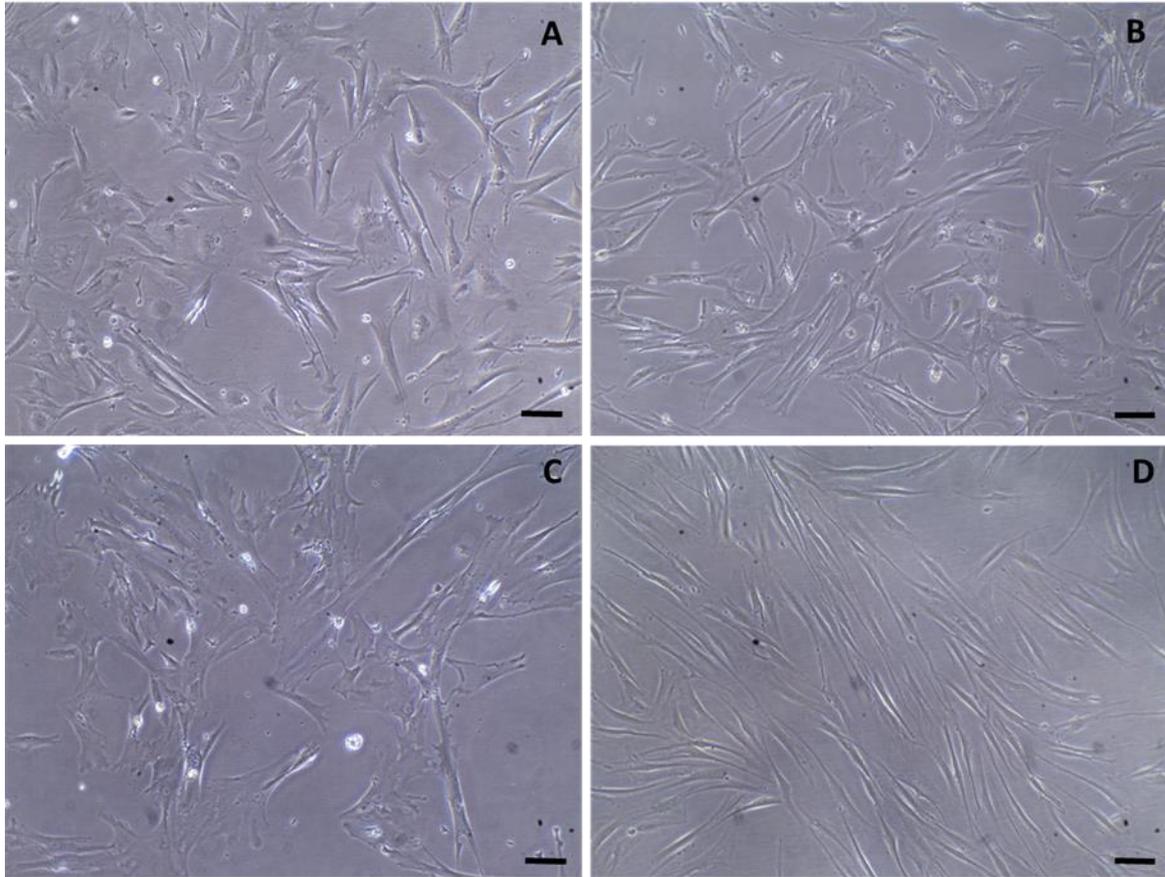


Figura 4. Células obtenidas por cultivo primario. Microfotografías representativas de células adiposas caninas (A-B), células adiposas mesenquimales humanas (C) y fibroblastos epidérmicos humanos (D). Barra = 100 μ m.

Ensayo de MTT

La prueba de viabilidad celular MTT realizada durante los días 3, 7, 9 de cultivo, nos confirmó que no existe una diferencia estadísticamente significativa, según el método ANOVA propuesto, entre la densidad celular y viabilidad de las células obtenidas de cultivo primario de grasa canina con la línea celular de MSCs humanas (Fig. 5).

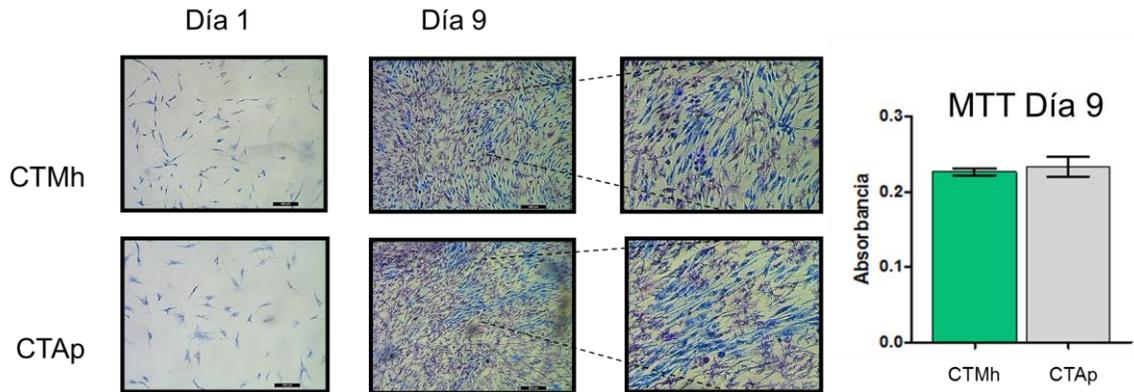


Figura 5. Ensayo de viabilidad celular. Se puede observar que no existe diferencia entre los cultivos primarios de tejido adiposo canino (CTAp) y la línea celular de células troncales mesenquimales humanas (hMSCs).

Caracterización del cultivo primario.

Para conocer si las células obtenidas por cultivo primario, durante el proceso de aislamiento y proliferación celular, presentaban marcadores de células troncales mesenquimales, se realizó una batería de marcaje con los siguientes anticuerpos; CD44, CD45, CD90 e integrina, marcadores de superficie encontrados en las MSCs. Al realizar las inmunotinciones encontramos que las células obtenidas de cultivo primario de tejido adiposo de perro en comparación con las MSCs humanas, las cuales fungieron como control, co-expresaban las siguientes proteínas de superficie en un 85% +/- 5% para células CD 44+, CD45+, CD105+ al igual que las MSCs humanas e Integrina (-) (Fig. 6-8).

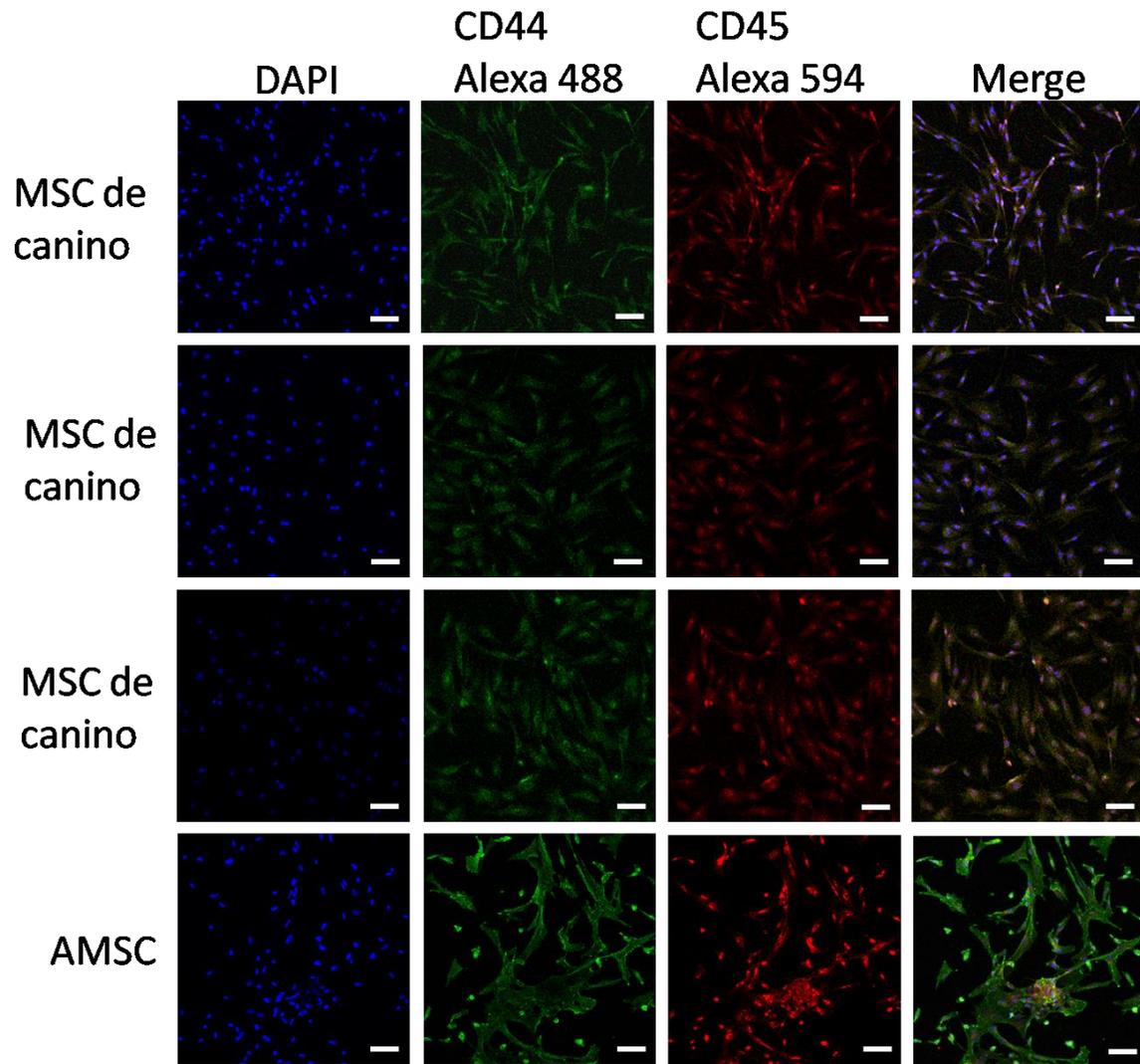


Figura 6. Microfotografías de marcaje inmunofluorescente sobre las células adiposas adherentes caninas. Se observa un marcaje positivo sobre el marcador de pluripotencia CD44, así como, una señal fluorescente sobre el marcador hematopoyético CD45 en las células adiposas aisladas. Barra = 100 μ m (MSC = Células estromales mesenquimales de perro, cada uno de los sujetos donadores se muestra en la imagen; AMSC= células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, en este ejemplo).

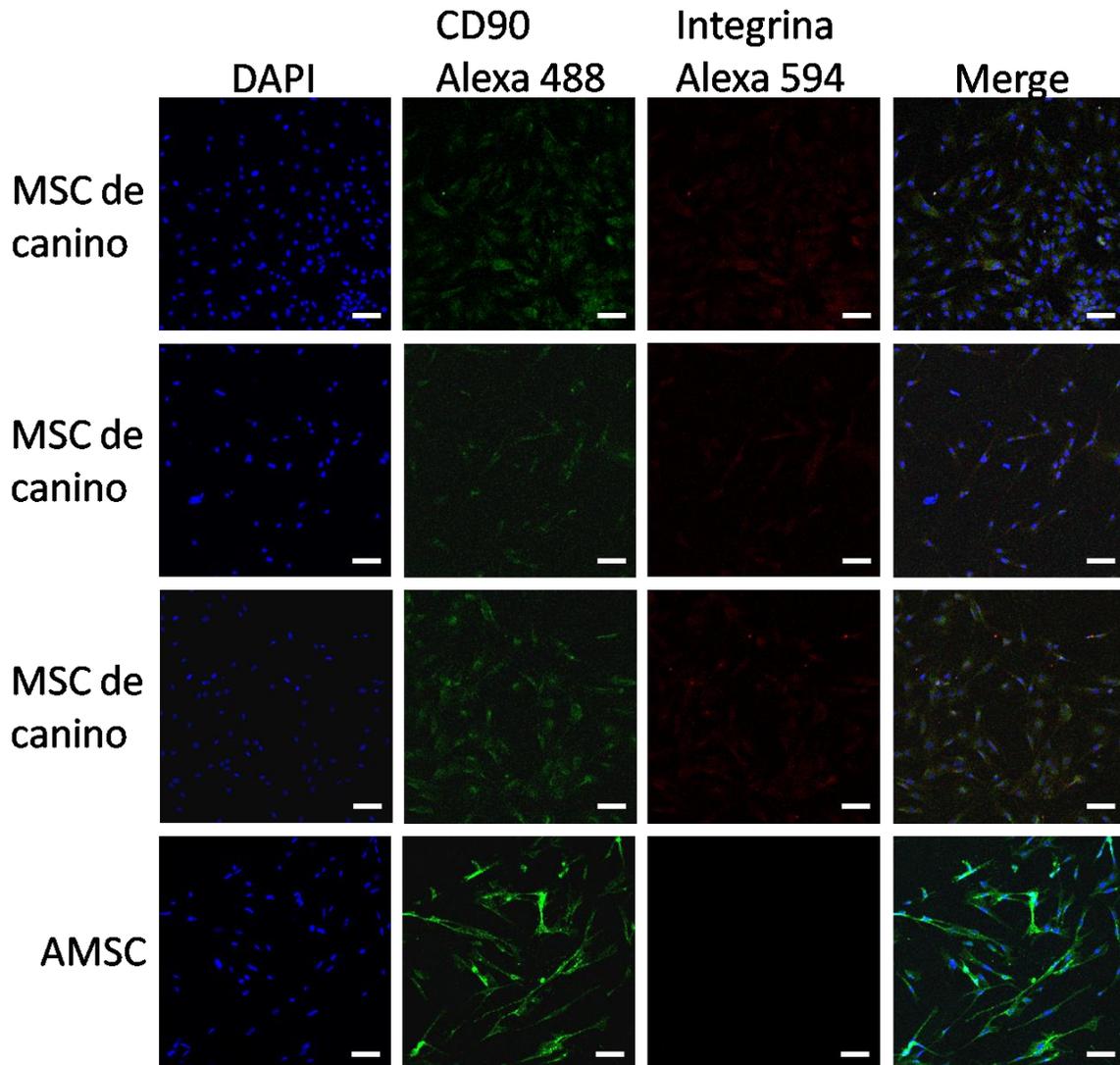


Figura 7. Microfotografías de tinción inmunofluorescente sobre las células adiposas adherentes caninas. Se observa una marca positiva sobre el marcador de pluripotencia CD90, así como, una señal débil sobre el marcador hematopoyético Integrina en las células adiposas aisladas. Barra = 100 μ m (MSC = Células estromales mesenquimales de perro, cada uno de los sujetos donadores se muestra en la imagen; AMSC= células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, en este ejemplo).

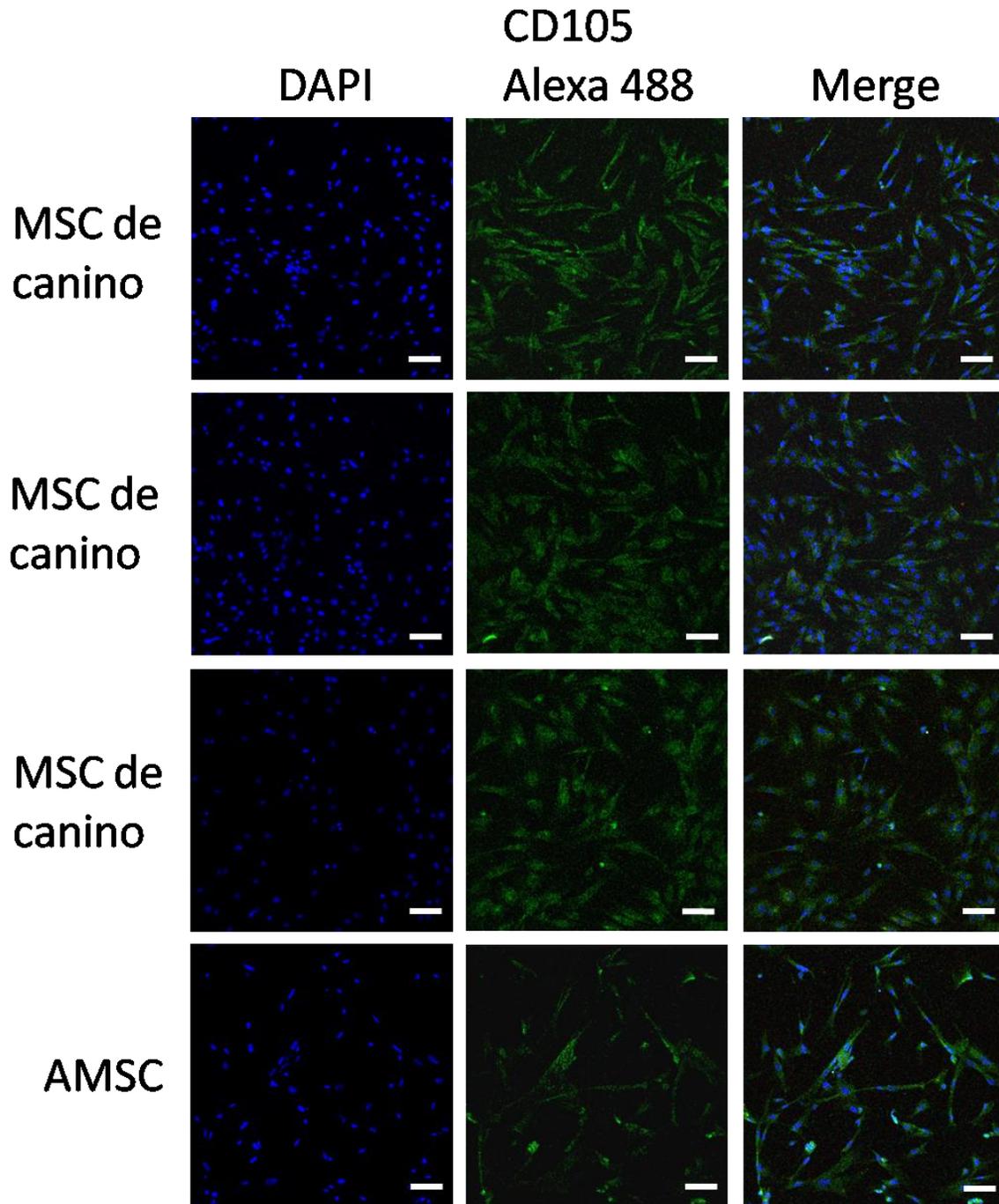


Figura 8. Microfotografías de tinción inmunofluorescente sobre las células adiposas adherentes caninas. Se observa un marcaje positivo sobre el marcador de pluripotencia CD105. Barra = 100 μm (MSC = Células estromales mesenquimales de perro, cada uno de los sujetos donadores se muestra en la imagen; AMSC= células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, en este ejemplo).

Análisis de la expresión génica.

Una vez realizada la identificación del linaje y el marcaje de proteínas en la superficie celular, se realizó el análisis de expresión génica de los genes NANOG, POU5F y SOX2 mediante la técnica de RT-qPCR para ver la capacidad de pluripotencia asociada a marcadores expresados en las células troncales embrionarias y etapas muy tempranas del desarrollo en organismos pluricelulares como previamente se ha descrito (Han, Han et al. 2014). Por otra parte, las células MSC derivadas y expandidas de tejido adiposo expresaron de forma positiva para el factor de transcripción SOX2 (Fig. 9) y no así para NANOG (Fig. 10) o POU5F1 (Fig. 11) en contraste con las MSCs humanas en donde sí se detectó la expresión de todos los genes. En este experimento se utilizó como control de ensayo el gen constitutivo 18S (Fig. 12).

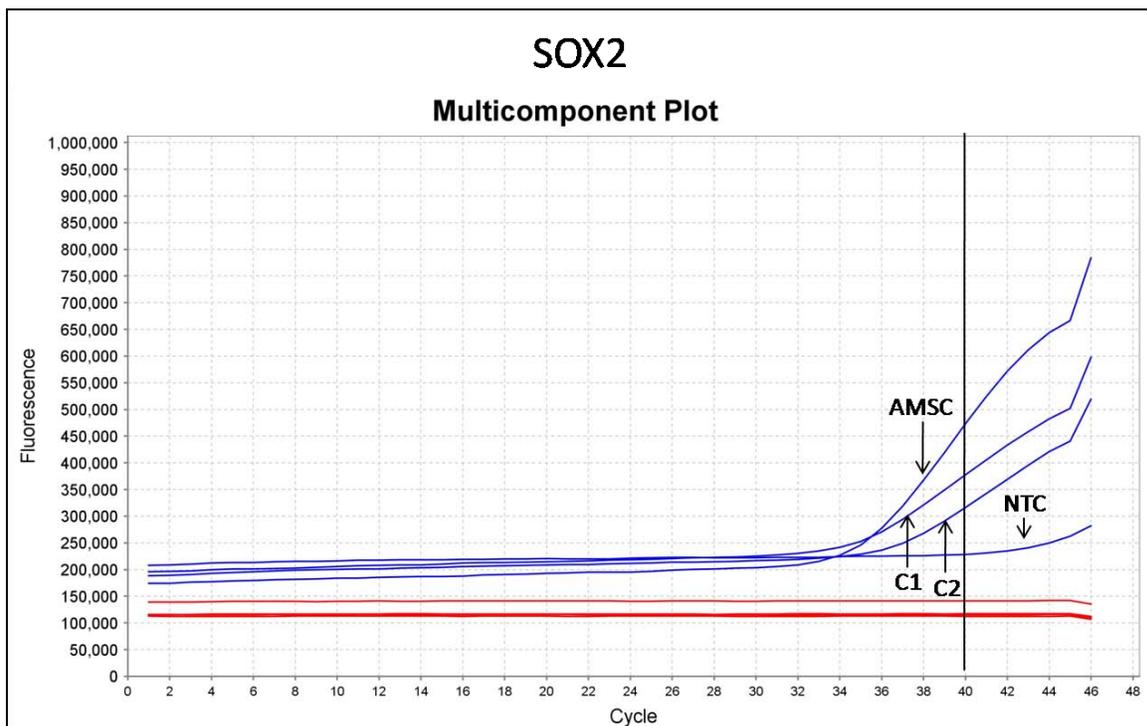


Figura 9. Análisis de RT-PCR sobre las células caninas aisladas para evaluar la expresión del gen SOX2 implicado en la pluripotencia celular (C1, C2 – muestras de cultivos caninos; AMSC – Células estromales mesenquimales adiposas de origen humano; Control sin plantilla [NTC, por sus siglas en inglés]).

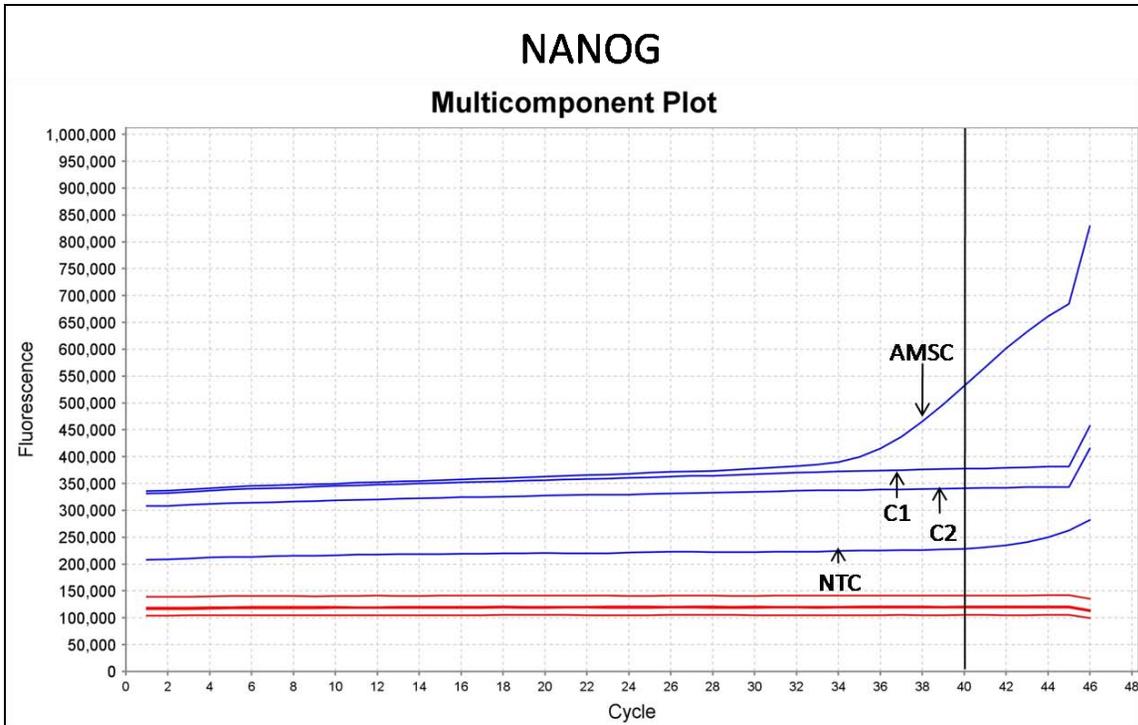


Figura 10. Análisis de RT-PCR para la expresión génica del gen de pluripotencia NANOG (C1, C2 – muestras de cultivos caninos; AMSC – Células estromales mesenquimales adiposas de origen humano; Control sin plantilla [NTC, por sus siglas en ingles]).

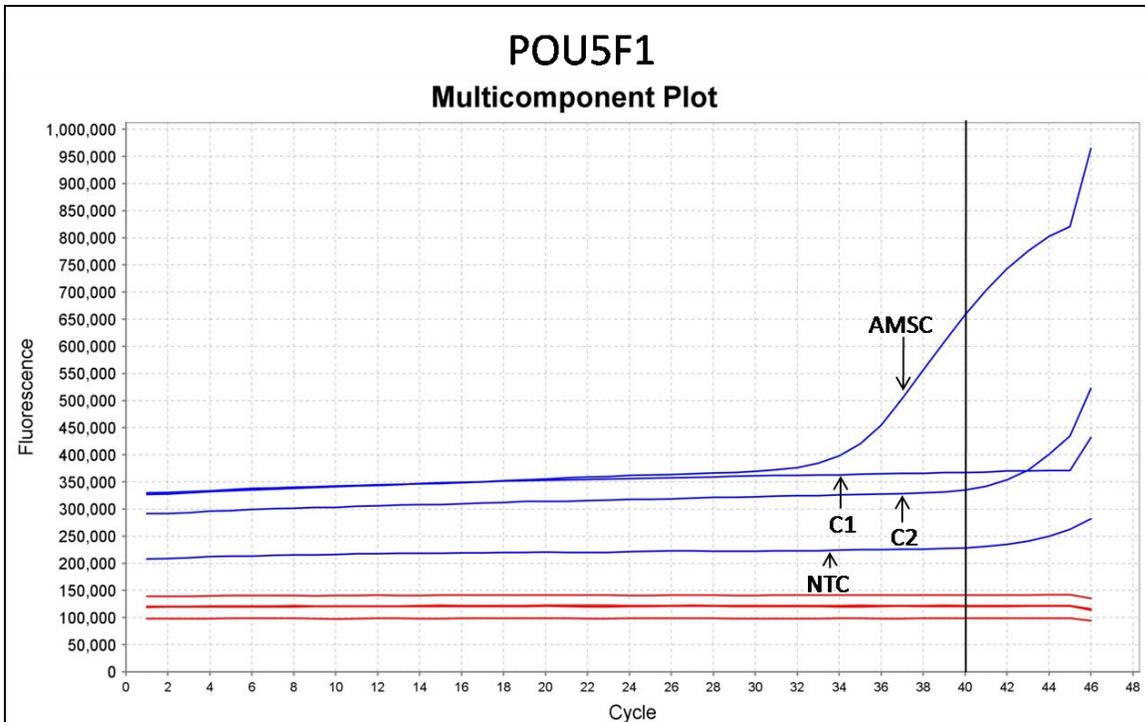


Figura 11. Análisis de RT-PCR para la expresión del gen POU5F1. (C1, C2 – muestras de cultivos caninos; AMSC – Células estromales mesenquimales adiposas de origen humano; Control sin plantilla [NTC, por sus siglas en ingles]).

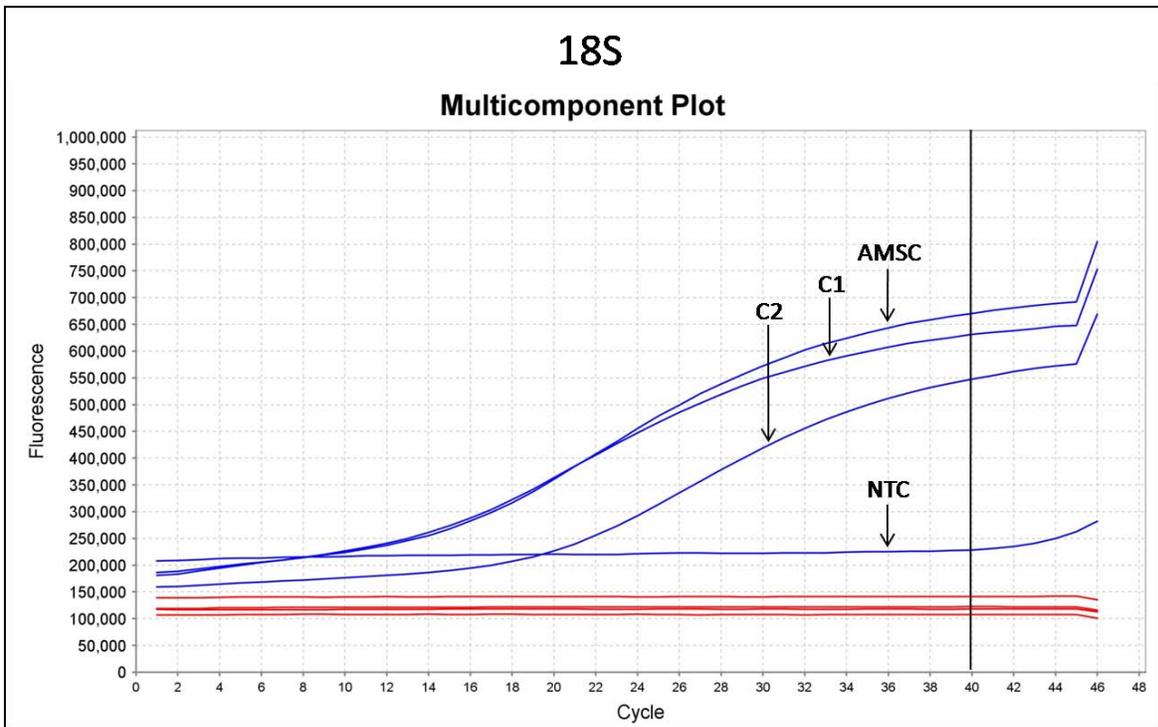


Figura 12. Análisis de RT-PCR para la expresión del gen constitutivo 18S (C1, C2 – muestras de cultivos caninos; AMSC – Células estromales mesenquimales adiposas de origen humano; Control sin plantilla [NTC, por sus siglas en ingles]).

VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años la terapia de reemplazo celular en pequeñas especies es una promesa cada día más alentadora, buscando satisfacer un mercado y una demanda específica en el sector de salud Veterinaria. Sin embargo, aún hace falta por definir varios factores.

La obtención, aislamiento y caracterización de MSCs en humanos está bien definida y existe un criterio muy estricto de validación y estandarización para el uso terapéutico en humanos (Dominici, Le Blanc et al. 2006, Krampera, Galipeau et al. 2013). Sin embargo en Medicina Veterinaria, aún faltan lineamientos por definir es por esto que en esta investigación se propuso al tejido adiposo subcutáneo como una probable fuente de MSCs en perros.

Las células troncales mesenquimales han demostrado tener grandes ventajas para su aplicación clínica, dada su gran capacidad de proliferación celular y una fuente fácil de obtención y aislamiento. Estudios anteriores afirman que el protocolo de obtención de células troncales mesenquimales de tejido adiposo depende de varios factores entre ellos la edad (Lee, Lee et al. 2016). Sin embargo, hay reportes en donde se obtienen buenos resultados en diferentes procesos patológicos con el uso de estas células. Es por eso que en este proyecto se propuso analizar la obtención de grasa de tejido subcutáneo y no grasa mesentérica como una fuente alternativa y de menor riesgo para un probable uso clínico veterinario.

Primeramente se realizó, el análisis de la viabilidad y supervivencia celular después de ser obtenido el tejido graso, en donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa en comparación con las células control, lo que demuestra una alta capacidad de dividirse y proliferar al igual que células obtenidas del mesenterio. Asimismo, se comprobó que una gran cantidad de

células podrían obtenerse en los primeros pasajes después de ser recolectadas al igual que una línea estandarizada de MSCs humanas. Sin embargo, durante la caracterización de las células de cultivo primario se observó como el antígeno de superficie de membrana CD45 fue positivo, algunos trabajos, así como la sociedad internacional de terapia celular consideran como una de las características básicas la ausencia o muy baja de expresión de este marcador (Horwitz, Le Blanc et al. 2005, Kisiel, McDuffee et al. 2012, Screven, Kenyon et al. 2014, Li, Wu et al. 2015). No obstante, al igual que en estudios previos se ha demostrado la presencia de niveles bajos de CD45 en algunas células mesenquimales obtenidas de tejido graso, el hallazgo de CD45 puede ser de forma transitoria ya que disminuye con los pasajes al igual que el marcador CD34 (Yu, Wu et al. 2010), tal vez esto sea observado por el sitio de obtención de la muestra, sin embargo, más estudios son necesarios para corroborar este hallazgo. Por otra parte, se observó una marca positiva para los demás marcadores de superficie confirmando las características que definen una población de MSCs.

Después de comprobar la expresión fenotípica de estos marcadores de superficie en los cultivos primarios de tejido graso (CD44, CD45, CD90, Integrina), se realizó un estudio de la expresión de factores transcripcionales involucrados en la proliferación y autorenovación, características indispensables de las MSCs. Al evaluar los resultados encontramos que las células de tejido adiposo expresan SOX2 marcador presente en otros linajes celulares como lo demuestran investigaciones previas (Saulnier, Loriau et al. 2016). Sin embargo, al igual que en otros trabajos previos la expresión de OCT4/POU5F y NANOG marcadores tempranos del desarrollo no fue detectada (Pierantozzi, Gava et al. 2011, Singh, Tripathy et al. 2013). Encontrando que las mejores condiciones fueron realizadas en el primer pasaje después de expandir el cultivo primario. Ya que al seguir proliferando o establecer ciclos de congelamiento/descongelamiento nos encontramos que las células con las características antes mencionadas dejan de proliferar y mueren.

Este método al ser no invasivo abre una nueva ventana de oportunidades en la

clínica y terapéutica veterinaria, ya que expresan algunos marcadores previamente reportados en células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo. Además, no comparte los marcadores de pluripotencia encontradas en células más primitivas y que por consiguiente aplicados en un organismo pudieran llegar a generar tumores. Finalmente hacen falta más estudios para hacer más eficiente este procedimiento y obtener una población celular homogénea de mayor calidad.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En resumen, nosotros pudimos conseguir el aislamiento y proliferación de MSCs provenientes de tejido adiposo en perros, mediante un proceso poco invasivo y sin la necesidad de anestésicos de manera general al perro, lo cual ofrecerá ventajas al no depender de equipo de anestesia o mayores complicaciones durante el proceso anestésico.

Los perros representan una invaluable herramienta como modelos de estudio y como animales de compañía, el estudio de las características evaluadas en este proyecto nos elucidará en saber y conocer el comportamiento de esta población de células mesenquimales en tejido subcutáneo y tratar de encontrar el correcto desarrollo de terapias para corregir algunos de los padecimientos más comunes en esta especie. Se pudo comprobar la similitud de las células obtenidas en el estudio con las que se han obtenido en otros estudios anteriores en humanos, por lo cual podríamos inferir un comportamiento experimental similar. Sin embargo, restan más experimentos para continuar evaluando el proceso de diferenciación celular y mejorar el proceso de cultivo preservación con el fin de obtener un banco de células troncales mesenquimales para una futura aplicación clínica en Medicina Veterinaria.

X. ABREVIATURAS

CT	Célula troncal
MSCs	Células troncales mesenquimales
CTA	Célula troncal adulta
mg/kg	Miligramos sobre kilogramo
min	Minutos
ml	Mililitros
g	Gramos
mm	Milímetros
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SFB	Suero Fetal Bovino
°C	Grados centígrados
PBS	Phosphate Buffered Saline (Bufer Salino de Fosfatos)
rpm	Revoluciones por minute
DMEM-KO	Dulbecco's Modified Eagle Medium KnockOut
mM	Milimolar
cm ²	Centímetro cuadrado
CO ₂	Dióxido de carbon
DMSO	Dimetil Sulfóxido
h	Horas
MTT	Prueba de reducción de bromuro de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán
nm	Nanómetros
μM	Micromolar
SNC	Suero Normal de Cabra
TA	Temperatura ambiente
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
ng	Nanogramos
μ l	Microlitros
pb	Pares de bases
μ m	Micrómetros
μ g	Microgramos

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuente de obtención y diferenciación celular.....	9
Figura 2. Región de la toma de muestras en los perros.....	24
Figura 3. Esquema representativo del aislamiento de células troncales mesenquimales a partir de una muestra de tejido adiposo canino.....	32
Figura 4. Células obtenidas por cultivo primario a partir de tejido graso.....	33
Figura 5. Ensayo de viabilidad celular.....	34
Figura 6. Microfotografías de marcaje inmunofluorescente sobre las células adiposas adherentes caninas marcadores CD44 y CD45	35
Figura 7. Microfotografías de marcaje inmunofluorescente sobre las células adiposas adherentes caninas marcadores CD90 e integrina.....	36
Figura 8. Microfotografías de marcaje inmunofluorescente sobre las células adiposas adherentes caninas marcador DC105.....	37
Figura 9. Análisis de RT-PCR sobre las células caninas aisladas para evaluar la expresión del gen SOX2 implicado en la pluripotencia celular.....	38
Figura 10. Análisis de RT-PCR para la expresión génica del gen de pluripotencia NANOG.....	39
Figura 11. Análisis de RT-PCR para la expresión del gen POU5F1.....	39
Figura 12. Análisis de RT-PCR para la expresión del gen constitutivo 18S.....	40

XI. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios y el factor de dilución utilizada durante la etapa de caracterización.....	26
Tabla 2. Primers empleados en el ensayo de RT-PCR para la expresión génica del mRNA de pluripotencia.....	29
Tabla 3. Reactivos y volumen por cada reacción de 12 µl para el ensayo de RT-qPCR.....	29

XII. REFERENCIAS

- Alison, M. R. and S. Islam (2009). "Attributes of adult stem cells." J Pathol **217**(2): 144-160.
- Altman, E., P. Yango, R. Moustafa, J. F. Smith, P. C. Klatsky and N. D. Tran (2014). "Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues." Reproduction **148**(4): 417-427.
- Augier, F., E. Salf and J. B. Nottet (1996). "[Dr. Samuel Serge Voronoff (1866-1951) or "the quest for eternal youth"]." Hist Sci Med **30**(2): 163-171.
- Billing, A. M., H. Ben Hamidane, S. S. Dib, R. J. Cotton, A. M. Bhagwat, P. Kumar, S. Hayat, N. A. Yousri, N. Goswami, K. Suhre, A. Rafii and J. Graumann (2016). "Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers." Sci Rep **6**: 21507.
- Blau, H. M., T. R. Brazelton and J. M. Weimann (2001). "The evolving concept of a stem cell: entity or function?" Cell **105**(7): 829-841.
- Bonnemain, V., I. Neveu and P. Naveilhan (2012). "Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system." Front Cell Neurosci **6**: 17.
- Boxall, S. A. and E. Jones (2012). "Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells." Stem Cells Int **2012**: 975871.
- Burk, J., D. Berner, W. Brehm, A. Hillmann, C. Horstmeier, C. Josten, F. Paebst, G. Rossi, S. Schubert and A. B. Ahrberg (2016). "Long-Term Cell Tracking following Local Injection of Mesenchymal Stromal Cells in the Equine Model of Induced Tendon Disease." Cell Transplant.
- Burk, J., I. Ribitsch, C. Gittel, H. Juelke, C. Kasper, C. Staszky and W. Brehm (2013). "Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources." Vet J **195**(1): 98-106.
- Camilleri, E. T., M. P. Gustafson, A. Dudakovic, S. M. Riester, C. G. Garces, C. R. Paradise, H. Takai, M. Karperien, S. Cool, H. J. Sampen, A. N. Larson, W. Qu, J. Smith, A. B. Dietz and A. J. van Wijnen (2016). "Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production." Stem Cell Res Ther **7**(1): 107.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-650.
- Carbone, A., M. Valente, L. Annacontini, S. Castellani, S. Di Gioia, D. Parisi, M. Rucci, G. Belgiovine, C. Colombo, A. Di Benedetto, G. Mori, L. Lo Muzio, A. Maiorella, A. Portincasa and M. Conese (2016). "Adipose-derived mesenchymal stromal (stem) cells differentiate to osteoblast and chondroblast lineages upon incubation with conditioned media from dental pulp stem cell-derived osteoblasts and auricle cartilage chondrocytes." J Biol Regul Homeost Agents **30**(1): 111-122.
- Carvalho, E., P. Verma, K. Hourigan and R. Banerjee (2015). "Myocardial infarction: stem

cell transplantation for cardiac regeneration." Regen Med **10**(8): 1025-1043.

Clarke, D. and J. Frisen (2001). "Differentiation potential of adult stem cells." Curr Opin Genet Dev **11**(5): 575-580.

Clarke, R. B. (2005). "Isolation and characterization of human mammary stem cells." Cell Prolif **38**(6): 375-386.

Dariolli, R., V. Bassaneze, J. S. Nakamuta, S. V. Omae, L. C. Campos and J. E. Krieger (2013). "Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation." PLoS One **8**(7): e67939.

Davies, O. G., A. J. Smith, P. R. Cooper, R. M. Shelton and B. A. Scheven (2014). "The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues." Cryobiology **69**(2): 342-347.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.

Dontu, G. and M. S. Wicha (2005). "Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia." J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**(1): 75-86.

Dunlop, C. E., E. E. Telfer and R. A. Anderson (2014). "Ovarian germline stem cells." Stem Cell Res Ther **5**(4): 98.

Eggenhofer, E., F. Luk, M. H. Dahlke and M. J. Hoogduijn (2014). "The life and fate of mesenchymal stem cells." Front Immunol **5**: 148.

Egusa, H., W. Sonoyama, M. Nishimura, I. Atsuta and K. Akiyama (2012). "Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources." J Prosthodont Res **56**(3): 151-165.

Feron, F., C. Perry, S. D. Girard and A. Mackay-Sim (2013). "Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa." Methods Mol Biol **1059**: 107-114.

Filioli Uranio, M., M. E. Dell'Aquila, M. Caira, A. C. Guaricci, M. Ventura, C. R. Catacchio, N. A. Martino and L. Valentini (2014). "Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age." Mol Reprod Dev **81**(6): 539-551.

Fortier, L. A. (2005). "Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications." Vet Surg **34**(5): 415-423.

Fortier, L. A. and A. J. Travis (2011). "Stem cells in veterinary medicine." Stem Cell Res Ther **2**(1): 9.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja and N. N. Kulagina (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-274.

Friedenstein, A. J., A. A. Ivanov-Smolenski, R. K. Chajlakjan, U. F. Gorskaya, A. I. Kuralesova, N. W. Latzinik and U. W. Gerasimow (1978). "Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants." Exp Hematol **6**(5): 440-444.

Ghaedi, M. and L. E. Niklason (2016). "Human Pluripotent Stem Cells (iPSC) Generation, Culture, and Differentiation to Lung Progenitor Cells." Methods Mol Biol.

Gill, K. P., S. S. Hung, A. Sharov, C. Y. Lo, K. Needham, G. E. Lidgerwood, S. Jackson, D. E. Crombie, B. A. Nayagam, A. L. Cook, A. W. Hewitt, A. Pebay and R. C. Wong (2016). "Enriched retinal ganglion cells derived from human embryonic stem cells." Sci Rep **6**: 30552.

Gonzalez-Fernandez, M. L., S. Perez-Castrillo, J. A. Sanchez-Lazaro, J. G. Prieto-

Fernandez, M. E. Lopez-Gonzalez, S. Lobato-Perez, B. J. Colaco, E. R. Olivera and V. Villar-Suarez (2016). "Assessment of regeneration in meniscal lesions by use of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue." Am J Vet Res **77**(7): 779-788.

Han, S. M., S. H. Han, Y. R. Coh, G. Jang, J. Chan Ra, S. K. Kang, H. W. Lee and H. Y. Youn (2014). "Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells." Exp Mol Med **46**: e101.

Haubold, H. (1954). "[Cellular therapy according to Paul Niehans or K. Fr. Bauer's method]." Med Klin **49**(37): 1468-1472.

Hauser, S., D. Widera, F. Qunneis, J. Muller, C. Zander, J. Greiner, C. Strauss, P. Luningschror, P. Heimann, H. Schwarze, J. Ebmeyer, H. Sudhoff, M. J. Arauzo-Bravo, B. Greber, H. Zaehres, H. Scholer, C. Kaltschmidt and B. Kaltschmidt (2012). "Isolation of novel multipotent neural crest-derived stem cells from adult human inferior turbinate." Stem Cells Dev **21**(5): 742-756.

Hoggatt, J. and D. T. Scadden (2012). "The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level." J Clin Invest **122**(9): 3029-3034.

Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, A. Keating and T. International Society for Cellular (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **7**(5): 393-395.

Hou, L., H. Cao, D. Wang, G. Wei, C. Bai, Y. Zhang and X. Pei (2003). "Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro." Int J Hematol **78**(3): 256-261.

Hurtado, M. d. I. M. (1984). "LEY GENERAL DE SALUD. ." Diario Oficial de la Federación, México D F. : 257.

Jackson, K. A., S. M. Majka, H. Wang, J. Pocius, C. J. Hartley, M. W. Majesky, M. L. Entman, L. H. Michael, K. K. Hirschi and M. A. Goodell (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." J Clin Invest **107**(11): 1395-1402.

Jones, D. L. and A. J. Wagers (2008). "No place like home: anatomy and function of the stem cell niche." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 11-21.

Khojasteh, A., F. Fahimipour, M. Jafarian, D. Sharifi, S. Jahangir, F. Khayyatan and M. Baghaban Eslaminejad (2016). "Bone engineering in dog mandible: Coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor." J Biomed Mater Res B Appl Biomater.

Kim, H. W., W. J. Song, Q. Li, S. M. Han, K. O. Jeon, S. C. Park, M. O. Ryu, H. K. Chae, K. Kyeong and H. Y. Youn (2016). "Canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate severe acute pancreatitis by regulating T cells in rats." J Vet Sci.

Kim, Y., S. H. Lee, B. J. Kang, W. H. Kim, H. S. Yun and O. K. Kweon (2016). "Comparison of Osteogenesis between Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Sheets on Poly-epsilon-Caprolactone/beta-Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds in Canine Bone Defects." Stem Cells Int **2016**: 8414715.

Kisiel, A. H., L. A. McDuffee, E. Masaoud, T. R. Bailey, B. P. Esparza Gonzalez and R. Nino-Fong (2012). "Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum." Am J Vet Res **73**(8): 1305-1317.

Krampera, M., J. Galipeau, Y. Shi, K. Tarte, L. Sensebe and M. S. C. C. o. t. I. S. f. C.

Therapy (2013). "Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal." Cytotherapy **15**(9): 1054-1061.

Kroger, N., T. Giorgino, B. L. Scott, M. Ditschkowski, H. Alchalby, F. Cervantes, A. Vannucchi, M. Cazzola, E. Morra, T. Zabelina, M. Maffioli, A. Pereira, D. Beelen, H. J. Deeg and F. Passamonti (2015). "Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis." Blood **125**(21): 3347-3350; quiz 3364.

Lang, H., E. Nishimoto, Y. Xing, L. N. Brown, K. V. Noble, J. L. Barth, A. C. LaRue, K. Ando and B. A. Schulte (2016). "Contributions of mouse and human hematopoietic cells to remodeling of the adult auditory nerve after neuron loss." Mol Ther.

Lee, J., K. S. Lee, C. L. Kim, J. S. Byeon, N. Y. Gu, I. S. Cho and S. H. Cha (2016). "Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells." J Vet Sci.

Leeper, N. J., A. L. Hunter and J. P. Cooke (2010). "Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells." Circulation **122**(5): 517-526.

Lefrere, J. J. and P. Berche (2010). "[Doctor Brown-Sequard's therapy]." Ann Endocrinol (Paris) **71**(2): 69-75.

Li, C. Y., X. Y. Wu, J. B. Tong, X. X. Yang, J. L. Zhao, Q. F. Zheng, G. B. Zhao and Z. J. Ma (2015). "Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy." Stem Cell Res Ther **6**: 55.

Li, H., R. Ghazanfari, D. Zacharaki, H. C. Lim and S. Scheduling (2016). "Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells." Ann N Y Acad Sci **1370**(1): 109-118.

Maehle, A. H. (2011). "Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries." Notes Rec R Soc Lond **65**(4): 359-378.

Martinello, T., I. Bronzini, L. Maccatrozzo, A. Mollo, M. Sampaolesi, F. Mascarello, M. Decaminada and M. Patruno (2011). "Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation." Res Vet Sci **91**(1): 18-24.

Mayani, H. (2003). "A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance." Arch Med Res **34**(1): 3-15.

McCulloch, E. A. and J. E. Till (1960). "The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice." Radiat Res **13**: 115-125.

Mothe, A. and C. H. Tator (2015). "Isolation of Neural Stem/Progenitor Cells from the Periventricular Region of the Adult Rat and Human Spinal Cord." J Vis Exp(99): e52732.

Mundra, V., I. C. Gerling and R. I. Mahato (2013). "Mesenchymal stem cell-based therapy." Mol Pharm **10**(1): 77-89.

Munoz, J., N. Shah, K. Rezvani, C. Hosing, C. M. Bollard, B. Oran, A. Olson, U. Popat, J. Molldrem, I. K. McNiece and E. J. Shpall (2014). "Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future." Stem Cells Transl Med **3**(12): 1435-1443.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston and J. A. Coverdale (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." Blood **97**(8): 2293-2299.

Obrador, A. M. L. (2002). "CÓDIGO PENAL PARA EL DISTRITO FEDERAL. ." Gaceta Oficial del Distrito Federal.

Oh, M. and J. E. Nor (2015). "The Perivascular Niche and Self-Renewal of Stem Cells." Front Physiol **6**: 367.

Ohnishi, Y., K. Iwatsuki, M. Ishihara, T. Shikina, K. Shinzawa, T. Moriwaki, K. Ninomiya, T. Ohkawa, M. Umegaki, H. Kishima and T. Yoshimine (2015). "Isolation of human adult olfactory sphere cells as a cell source of neural progenitors." Stem Cell Res **15**(1): 23-29.

Parekkadan, B. and J. M. Milwid (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics." Annu Rev Biomed Eng **12**: 87-117.

Pelaez, D., C. Y. Huang and H. S. Cheung (2013). "Isolation of pluripotent neural crest-derived stem cells from adult human tissues by connexin-43 enrichment." Stem Cells Dev **22**(21): 2906-2914.

Penny, J., P. Harris, K. M. Shakesheff and A. Mobasher (2012). "The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 892-908.

Pierantozzi, E., B. Gava, I. Manini, F. Roviello, G. Marotta, M. Chiavarelli and V. Sorrentino (2011). "Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2." Stem Cells Dev **20**(5): 915-923.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Putnam, A. J. (2014). "The Instructive Role of the Vasculature in Stem Cell Niches." Biomater Sci **2**(11): 1562-1573.

Ramalho-Santos, M. and H. Willenbring (2007). "On the origin of the term "stem cell"." Cell Stem Cell **1**(1): 35-38.

Rector, K., Y. Liu and G. Van Zant (2013). "Comprehensive hematopoietic stem cell isolation methods." Methods Mol Biol **976**: 1-15.

Reich, C. M., O. Raabe, S. Wenisch, P. S. Bridger, M. Kramer and S. Arnhold (2012). "Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study." Vet Res Commun **36**(2): 139-148.

Renzi, S., T. Lombardo, S. Dotti, S. S. Dessi, P. De Blasio and M. Ferrari (2012). "Mesenchymal stromal cell cryopreservation." Biopreserv Biobank **10**(3): 276-281.

Salem, H. K. and C. Thiemermann (2010). "Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status." Stem Cells **28**(3): 585-596.

Saulnier, N., J. Loriau, M. Febre, C. Robert, R. Rakic, T. Bonte, S. Buff and S. Maddens (2016). "Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells?" Vet Immunol Immunopathol **171**: 47-55.

Screven, R., E. Kenyon, M. J. Myers, H. F. Yancy, M. Skasko, L. Boxer, E. C. Bigley, 3rd, D. L. Borjesson and M. Zhu (2014). "Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow." Vet Immunol Immunopathol **161**(1-2): 21-31.

Shen, J., J. Zheng, R. Saxena, C. Zhang and L. Tang (2015). "Novel source of human hematopoietic stem cells from peritoneal dialysis effluents." Stem Cell Res **15**(2): 299-304.

Shostak, S. (2006). "(Re)defining stem cells." Bioessays **28**(3): 301-308.

Singh, S. P., N. K. Tripathy and S. Nityanand (2013). "Comparison of phenotypic markers and neural differentiation potential of multipotent adult progenitor cells and mesenchymal stem cells." World J Stem Cells **5**(2): 53-60.

Spencer, N. D. and M. J. Lopez (2011). "In vitro adult canine adipose tissue-derived

stromal cell growth characteristics." Methods Mol Biol **702**: 47-60.

Sprio, A. E., F. Di Scipio, S. Raimondo, P. Salamone, F. Pagliari, S. Pagliari, A. Folino, G. Forte, S. Geuna, P. Di Nardo and G. N. Berta (2012). "Self-renewal and multipotency coexist in a long-term cultured adult rat dental pulp stem cell line: an exception to the rule?" Stem Cells Dev **21**(18): 3278-3288.

Stewart, M. C. and A. A. Stewart (2011). "Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action." Vet Clin North Am Equine Pract **27**(2): 243-261.

Stromberg, A., M. Jansson, H. Fischer, E. Rullman, H. Hagglund and T. Gustafsson (2013). "Bone marrow derived cells in adult skeletal muscle tissue in humans." Skelet Muscle **3**(1): 12.

Takemitsu, H., D. Zhao, I. Yamamoto, Y. Harada, M. Michishita and T. Arai (2012). "Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells." BMC Vet Res **8**: 150.

Taylor, S. E., R. K. Smith and P. D. Clegg (2007). "Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?" Equine Vet J **39**(2): 172-180.

Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., J. H. Cannon, O. D. Sahler and J. W. Ferrebee (1959). "Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man." J Clin Invest **38**: 1709-1716.

Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., W. C. Lu and J. W. Ferrebee (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy." N Engl J Med **257**(11): 491-496.

Tincer, G., V. Mashkaryan, P. Bhattarai and C. Kizil (2016). "Neural stem/progenitor cells in Alzheimer's disease." Yale J Biol Med **89**(1): 23-35.

Torres-Espin, A., D. L. Corona-Quintanilla, J. Fores, I. Allodi, F. Gonzalez, E. Udina and X. Navarro (2013). "Neuroprotection and axonal regeneration after lumbar ventral root avulsion by re-implantation and mesenchymal stem cells transplant combined therapy." Neurotherapeutics **10**(2): 354-368.

Tsushima, F., J. Sakurai and H. Harada (2015). "A case of upper gingiva carcinoma with chronic graft-versus-host disease after allogenic bone marrow transplantation." Aust Dent J **60**(3): 404-407.

Vazquez-Zapien, G. J., M. Rojas-Lopez, R. J. Delgado-Macuil, L. R. Martinez-Nava, D. G. Perez-Ishiwara and M. M. Mata-Miranda (2014). "Histologic and spectroscopic study of pluripotent stem cells after implant in ocular traumatic injuries in a murine model." Stem Cell Res Ther **5**(5): 119.

Vieira, N. M., V. Brandalise, E. Zucconi, M. Secco, B. E. Strauss and M. Zatz (2010). "Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells." Cell Transplant **19**(3): 279-289.

Wagers, A. J. and I. L. Weissman (2004). "Plasticity of adult stem cells." Cell **116**(5): 639-648.

Wan, C. D., R. Cheng, H. B. Wang and T. Liu (2008). "Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **7**(1): 29-33.

Wang, F., D. Scoville, X. C. He, M. M. Mahe, A. Box, J. M. Perry, N. R. Smith, N. Y. Lei, P. S. Davies, M. K. Fuller, J. S. Haug, M. McClain, A. D. Gracz, S. Ding, M. Stelzner, J. C. Dunn, S. T. Magness, M. H. Wong, M. G. Martin, M. Helmrath and L. Li (2013). "Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and

colony-formation assay." Gastroenterology **145**(2): 383-395 e381-321.

Xu, J. Y., Y. K. Lee, Y. Wang and H. F. Tse (2014). "Therapeutic application of endothelial progenitor cells for treatment of cardiovascular diseases." Curr Stem Cell Res Ther **9**(5): 401-414.

You, H. J., S. Namgoong, S. K. Han, S. H. Jeong, E. S. Dhong and W. K. Kim (2015). "Wound-healing potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells in vitro--a pilot study." Cytotherapy **17**(11): 1506-1513.

Yu, G, X. Wu, M. A. Dietrich, P. Polk, L. K. Scott, A. A. Ptitsyn and J. M. Gimble (2010). "Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes." Cytotherapy **12**(4): 538-546.

Zaher, W., L. Harkness, A. Jafari and M. Kassem (2014). "An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses." Arch Toxicol **88**(5): 1069-1082.