

## AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES CANINAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO

N. B. Riaño\*, V. J. Vera<sup>1</sup>

Artículo recibido: 30 de septiembre de 2013 • Aprobado: 29 de mayo de 2014

### RESUMEN

Se caracterizaron células obtenidas del tejido adiposo subcutáneo de caninos para demostrar su naturaleza de células madre mesenquimales (ad-MSCs). Las células se cultivaron y expandieron bajo condiciones *in vitro*. Se determinó la presencia de marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 por citometría de flujo y PCR en tiempo real, siendo idéntico el perfil de expresión obtenido al reportado en células madre mesenquimales humanas. Se demostró su potencial de diferenciación mediante análisis de expresión génica por PCR en tiempo real luego de inducirlas a procesos de diferenciación osteogénica y adipogénica. La capacidad de diferenciación osteogénica se evidenció a través de la expresión de genes de tejido óseo (colágeno tipo I y osteonectina) en una cinética de expresión concordante con los eventos moleculares y celulares del desarrollo óseo *in vivo*. El potencial adipogénico se evaluó por la formación de vacuolas lipídicas intracelulares y la expresión del gen de lipoprotein-lipasa, acorde con el proceso *in vivo*. Se concluye que las células mesenquimales obtenidas del tejido adiposo de caninos cumplen los criterios morfológicos, de expresión de marcadores de superficie específicos y de capacidad de diferenciación mesodérmica, confirmando su naturaleza de células madre mesenquimales. Los resultados del presente trabajo indicaron que las ad-MSCs de los caninos son un excelente modelo preclínico para el desarrollo de aplicaciones en medicina regenerativa, tanto en medicina veterinaria, como en medicina humana.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales caninas, diferenciación osteogénica, diferenciación adipogénica.

## ISOLATION, CHARACTERIZATION AND POTENTIAL DIFFERENTIATION OF CANINE MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE

### ABSTRACT

Cells obtained from the canine subcutaneous adipose tissue were characterized to demonstrate the nature of mesenchymal stem cells (adMSCs). The cells were cultured and expanded *in vitro* conditions. The presence of the surface markers CD73, CD90 and CD105 by flow cytometry and real time PCR was determined. The expression profile is identical to that reported in human mesenchymal stem cells. The differentiation potential was demonstrated by gene expression by real time PCR after induction osteogenic and adipogenic. Osteogenic differentiation was evidenced by the expression of genes of bone tissue (type I

<sup>1</sup> Departamento de Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Cr. 30 nro. 45-03, Bogotá (Colombia).

\* Autor para correspondencia: nbrianog@gmail.com

collagen and osteonectin) in expression kinetics consistent with the molecular and cellular events of bone development *in vivo*. In the adipogenic differentiation, were the formation of intracellular lipid vacuoles and expression of lipoprotein lipase gene (LPS), according to the *in vivo* process. We conclude that mesenchymal, cells derived from adipose tissue of dog, meet the morphological criteria, expression of specific surface markers and mesodermal differentiation capacity, confirming the nature of mesenchymal stem cells. The canine mesenchymal stem cells are an excellent preclinical model for developing applications in regenerative medicine that can be used both in veterinary and human medicine.

**Key words:** Mesenchymal canine stem cells, osteogenic differentiation, adipogenic differentiation.

## INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSCs, acrónimo derivado de *Mesenchymal Stromal/Stem Cells*) son células de origen adulto o somático, indiferenciadas, dotadas de la capacidad de originar células comprometidas en determinadas rutas de desarrollo mesodérmico que se convertirán finalmente, por diferenciación, en tipos celulares especializados morfológica y funcionalmente (Friedenstein *et al.* 1970; Friedenstein *et al.* 1976). En humanos, la principal fuente para su obtención ha sido la médula ósea (Pittenger *et al.* 1999; Prockop *et al.* 1997; Reyes y Verfaillie 2001), al igual que en caninos (Hodgkiss-Geere *et al.* 2012; Jun *et al.* 2011).

Así mismo, se han reportado aislamientos de MSCs de otras fuentes, siendo el tejido adiposo subcutáneo una novedosa opción de obtención, tanto en seres humanos (Aust *et al.* 2004; Choi *et al.* 2011; Nakagami *et al.* 2006; Schaffery Buchler 2007; Zuk *et al.* 2002), como en caninos (Calloni *et al.* 2014; Martinello *et al.* 2011; Neupane *et al.* 2008; Reich *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2010). El tejido adiposo posee un espacio correspondiente a la fracción celular vascular estromal (SVF), considerada reserva de células estromales pluripotenciales obtenidas luego de la digestión con colagenasa (Choi *et al.* 2011; Nakagami *et al.* 2006; Schaffery Buchler 2007; Zuk *et al.* 2002), las cuales se

denominan ‘células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo’ o ad-MSCs (*adipose derived Mesenchymal Stem cells*), con potencial de diferenciación y características en cultivo fenotípicas similares a las MSCs obtenidas a partir de médula ósea, como se ha demostrado en seres humanos (Alfonso *et al.* 2002; De Ugarte *et al.* 2003; Gronthos *et al.* 2001; Gimble y Guilak 2003a; Gimble y Guilak 2003b; Nakagami *et al.* 2006; Schaffery Buchler, 2007; Zuk *et al.* 2002). Las ad-MSCs se pueden aislar aún en pequeños volúmenes de tejido, incluso empleando metodologías no enzimáticas, como el uso de la siembra directa del tejido en forma de explantes (Beltrán 2007).

Para definir las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *Internacional Society for Cellular Therapy*) estableció que se debe demostrar su morfología fibroblastoide y la adherencia al plástico. De igual manera, expresar como mínimo los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73 y no mostrar expresión de marcadores de células hematopoyéticas como CD34 y CD45. Además, deben ser capaces de diferenciarse a otros linajes celulares mesodérmicos (Dominici *et al.* 2006; Horwitz *et al.* 2002).

Los caninos pueden ser relevantes como modelo animal para la obtención de MSCs y son ideales para instaurar nuevos tratamien-

tos con células debido a la susceptibilidad de desarrollar procesos degenerativos en su sistema músculo-esquelético (Black *et al.* 2008; Santoscoy y Hernández 2005; Schaefer 2006). Se ha estudiado el efecto tópico del trasplante de MSCs homólogo en caninos con heridas cutáneas, lográndose una rápida clausura de la herida e incremento en la síntesis de colágeno (Kim *et al.* 2013). Así mismo, el potencial de diferenciación osteogénica de las MSCs puede permitir la restauración de la unión ósea; se han hecho injertos óseos como tratamiento al retraso de cicatrización con la finalidad de brindar estabilidad mecánica. Actualmente se busca que un injerto natural que tenga precursores osteogénicos y factores que promuevan el crecimiento del nuevo tejido (Santoscoy y Hernández 2005).

Para llegar a una adecuada aplicación de este tipo de células es necesario tener un conocimiento profundo de la naturaleza de las mismas, mediante su caracterización, antes de cualquier aplicación clínica. Por sus propiedades, las ad-MSCs ofrecen un futuro prometedor en el tratamiento de enfermedades en medicina veterinaria.

El tejido adiposo en caninos, como fuente de ad-MSCs con fines terapéuticos, muestra una gran ventaja por su amplia distribución corporal en caninos, permitiendo la extracción mediante técnicas quirúrgicas poco complejas, circunstancia práctica en el campo veterinario, aún en animales de razas pequeñas o muy jóvenes. Se ha demostrado su capacidad de diferenciación a algunos linajes mesodérmicos (Calloni *et al.* 2014; Reich *et al.* 2012; Requicha *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2010).

La presente investigación buscó determinar las condiciones para la obtención y cultivo de ad-MSCs obtenidas de tres razas de caninos, realizar su caracterización de acuerdo con criterios morfológicos y

de expresión de marcadores de superficie específicos y su diferenciación a los linajes osteogénico y adipogénico mediante la técnica del explante directo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales experimentales

Las muestras de tejido graso subcutáneo fueron obtenidas de la pared abdominal de tres (3) caninos de diferentes razas en buenas condiciones físicas, con edades entre 2 y 6 años, y sin distinción de sexo (Tabla 1), los cuales estaban programados para la realización de laparotomía exploratoria y esterilización. Para la extracción de las muestras del presente estudio no fueron sometidos a ningún procedimiento adicional.

### Toma de las muestras

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas durante el procedimiento quirúrgico, a partir de tejido subcutáneo de pared abdominal. Se tomó 1 cm<sup>3</sup> de tejido y se depositó en tubo estéril sin ningún aditivo, conservándose a temperatura ambiente hasta su cultivo en el laboratorio de células.

### Cultivo del tejido adiposo

El tejido adiposo fue fragmentado con bisturí y pinzas estériles, obteniéndose muestras de tejido entre 0.2 y 0.5 cm<sup>2</sup>

**TABLA 1.** Características de los caninos de los cuales se obtuvieron las muestras de tejido graso.

Raza	Sexo	Edad
Yorkshire Terrier	Macho	3 años
Gran Danés	Hembra	2 años
Golden Retriever	Macho	6 años

de longitud, las cuales fueron lavadas tres veces con PBS adicionado de antibiótico (antibiótico-antimicótico, 100X, GIBCO) hasta retirar totalmente los restos de sangre. Cada fragmento se empleó como explante y fueron colocados en cada uno de los 6 pozos de cajas plásticas de poliestireno para cultivo de células (cajas Falcon), dejándolas sin tapar en la cabina de flujo laminar por 15 minutos, para permitir así la adherencia del explante a la superficie plástica. Posteriormente se le adicionó medio Dulbecco's *Modified Eagle Medium Low Glucose* (DMEM Low glucose, GIBCO) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (*Fetal bovine serum* Lot. 1333147, GIBCO) y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina G sódica: 10.000 U/ml, sulfato de estreptomina: 10.000 µg/ml y anfotericina B: 25 µg/ml) (Beltrán 2007; Catterson *et al.* 2002; Colter *et al.* 2001; Hung *et al.* 2006; Lee *et al.* 2004; Schutze *et al.* 2005). Los explantes se incubaron a una temperatura de 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se hizo el cambio del medio de cultivo dos veces por semana, hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70-90%. Se realizaron pasajes celulares desprendiendo las células con tripsina-EDTA al 0.25% (GIBCO).

### Caracterización de las ad-MSCs

Con el fin de determinar si las células aisladas del tejido adiposo canino eran MSCs se determinaron tres características basadas en lo que sugiere la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici *et al.* 2006; Horwitz *et al.* 2005):

1. Morfología fibroblastoide y adherencia al plástico en condiciones de cultivo.
2. Caracterización del fenotipo celular según la presencia de marcadores específicos.

3. Potencial de diferenciación *in vitro* hacia otros linajes mesodérmicos (osteogénico y adipogénico).

**Análisis de las ad-MSCs por citometría de flujo.** Para la realización de los análisis por citometría de flujo, las células aisladas fueron expandidas hasta alcanzar una confluencia del 70% y fueron desprendidas con tripsina hasta el pasaje 2. Las células se llevaron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células re-suspendidas en 500 µl de PBS y marcadas con 10 µl de cada uno de los siguientes anticuerpos: CD 34 monoclonal APC (Allophycocyanin, clon AC136, Miltenyi Biotec), CD 90 monoclonal APC (Allophycocyanin, Alexa fluor, clon F15-42-1, AbD, Serotec) y CD 105 monoclonal PE (Phycoerytrin, clon sn6, eBioscience).

La lectura se realizó en un citómetro Dako<sup>R</sup> modelo CyAn ADP Analyzer. Para cada corrida se utilizaron los controles de isotipo correspondientes. Se usaron como controles, células ad-MSCs sin marcar y células mononucleares de sangre periférica canina. Se analizaron aproximadamente 10.000 eventos en la región que corresponde a una población celular con alta complejidad y tamaño, y a continuación se realizó el análisis seleccionando en esta población para observar la expresión de los antígenos CD34, CD90 y CD105 de forma independiente.

**Caracterización por transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).** Para el aislamiento de RNA total de los cultivos de las células adherentes derivadas de tejido adiposo se utilizó el reactivo Trizol (TRIzol LS<sup>®</sup>, Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. La cuantificación del RNA fue realizada por medición con un fluorómetro (Qubit<sup>®</sup>, Invitrogen) emplean-

do Quant-iT® RNA Assay Kit (Invitrogen). Se realizó la síntesis de cDNA y la posterior PCR empleando el kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-StepqRT-PCR Kit en la plataforma para PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Real-Time PCR System, Roche). A un volumen final de 20 µl por reacción, con las enzimas transcriptasa reversa y *taq* DNA polimerasa, dNTPs, SYBR® green, según instrucciones del fabricante, empleando 1 µg de RNA total, se realizó inicialmente la síntesis de cDNA a una temperatura de 50°C durante tres minutos. A partir del cDNA obtenido por RT se determinó la expresión del mRNA mediante la técnica PCR en tiempo real con la metodología de detección de SYBR® green (Invitrogen) empleando pares de cebadores específicos (Tabla 2).

La qPCR inició con una temperatura de denaturación de 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a la temperatura de melting ( $T_m$ ). Para la generación de la curva de disociación se inició con 95°C seguidos de 55°C con un incremento a

95°C, 1°C cada ciclo por 15 segundos y un enfriamiento final de 40°C durante un minuto.

Con el fin de determinar el carácter de MSCs de las células aisladas a partir del tejido adiposo se analizó la expresión del marcador de superficie CD73 el cual es característico de células madre mesenquimales (Katz *et al.* 2005; McIntosh *et al.* 2006; Mitchell *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2005). Como control de la reacción se analizó la expresión del gen constitutivo GAPDH de la especie canina (Brinkhof *et al.* 2006). Para evaluar la expresión del marcador CD73 se desarrollaron los cebadores específicos diseñados con el sitio *web* del programa Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) partir de las secuencias de este gen reportadas en el sitio web del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Tabla 2).

### Ensayos del potencial de diferenciación

**Diferenciación osteogénica.** Las células cultivadas con una confluencia 80% de segundo pasaje fueron incubadas en medio

**TABLA 2.** Secuencias de iniciadores para marcador de superficie, marcadores de diferenciación y gen constitutivo GAPDH.

Gen	Número de acceso del GenBank	Secuencias	Producto Pb	Localización cromosómica en <i>Canis familiaris</i>
CD 73	XM_532221	Forward 5'GTACACCGCTATGGCCAGTC3' Reverse 5'GGCTCGTAAGTGGGTAAGTCG3'	143	Cromosoma 12
Osteonectina	XM_849889	Forward 5'GGTTCCCAGCACCATGAG3' Reverse 5'TCAGCCACGGTTTCCTCTAC3'	123	Cromosoma 4
Colágeno tipo I	NM_001003090	Forward 5'TGTTACAGCTTTGTGGACCTC3' Reverse 5'CTCGGGTTTCCATACGTCTC3'	155	Cromosoma 9
LPL	XM_534584.	Forward 5'GCAACAACATGGGCTATGAG3' Reverse 5'TGGTTGGTCTGTGCATCACT3'	151	Cromosoma 25
GAPDH	†	Forward 5'TGTCCCACCCCAATGTATC3' Reverse 5'CTCCGATGCCTTCACTACCTT3'	100	Cromosoma X

† Brinkhof *et al.* 2006.

de inducción osteogénica: DMEM con 10% SFB, 1% antibiótico antimicótico, dexametasona 0.1  $\mu\text{M}$  (Cat. No. 194560 MP<sup>®</sup>), ácido ascórbico 0.2 mM (MP<sup>®</sup>) y  $\beta$ -glicerol fosfato 10 mM (MP<sup>®</sup>) (Beltrán 2007; Vieira *et al.* 2007; Zuk *et al.* 2002). El medio de inducción osteogénica fue reemplazado dos veces por semana. Durante tres semanas las células fueron incubadas a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

En la primera, segunda y tercera semanas se realizó la extracción de RNA total con TRIzol<sup>®</sup> para analizar, por qRT-PCR, la expresión de los marcadores de diferenciación ósea, osteonectina (Zuk *et al.* 2002) y colágeno tipo I (Hodgkiss-Geere *et al.* 2012; Jafarian *et al.* 2008; Panepucci *et al.* 2004). A partir del cDNA obtenido por RT, se determinó la expresión del mRNA con la técnica PCR en tiempo real usando el termociclador LightCycler<sup>®</sup> de Roche y la metodología de detección de SYBR<sup>®</sup> green (Invitrogen). Para evaluar la expresión de los marcadores osteonectina y colágeno tipo I se desarrollaron los cebadores específicos diseñados con el programa Primer3<sup>®</sup> y a partir de las secuencias de este gen reportadas en el sitio web del GenBank.

**Diferenciación adipogénica.** Las células cultivadas con una confluencia 80% de segundo pasaje fueron incubadas en medio de inducción adipogénica: DMEM suplementado con 10% SFB, 1% de antibiótico antimicótico, dexametasona 1.0  $\mu\text{M}$  (Cat. No. 194560 MP<sup>®</sup>), 0.5 Mm 3-isobutil-metilxantina (MP<sup>®</sup>), 10  $\mu\text{M}$  Insulina (MP<sup>®</sup>) y 200  $\mu\text{M}$  Indometacina (MP<sup>®</sup>) (Beltrán 2007; Zuk *et al.* 2002). El medio de inducción fue reemplazado dos veces por semana durante tres semanas, incubando las células a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizaron

como controles negativos células incubadas en medio convencional. En la primera, segunda y tercera semana se realizó la extracción de RNA total para analizar por qRT-PCR la expresión del marcador de diferenciación adipogénica llamado lipoproteín lipasa (LPL) (Schutze *et al.* 2005; Vieira *et al.* 2007; Tuli *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004).

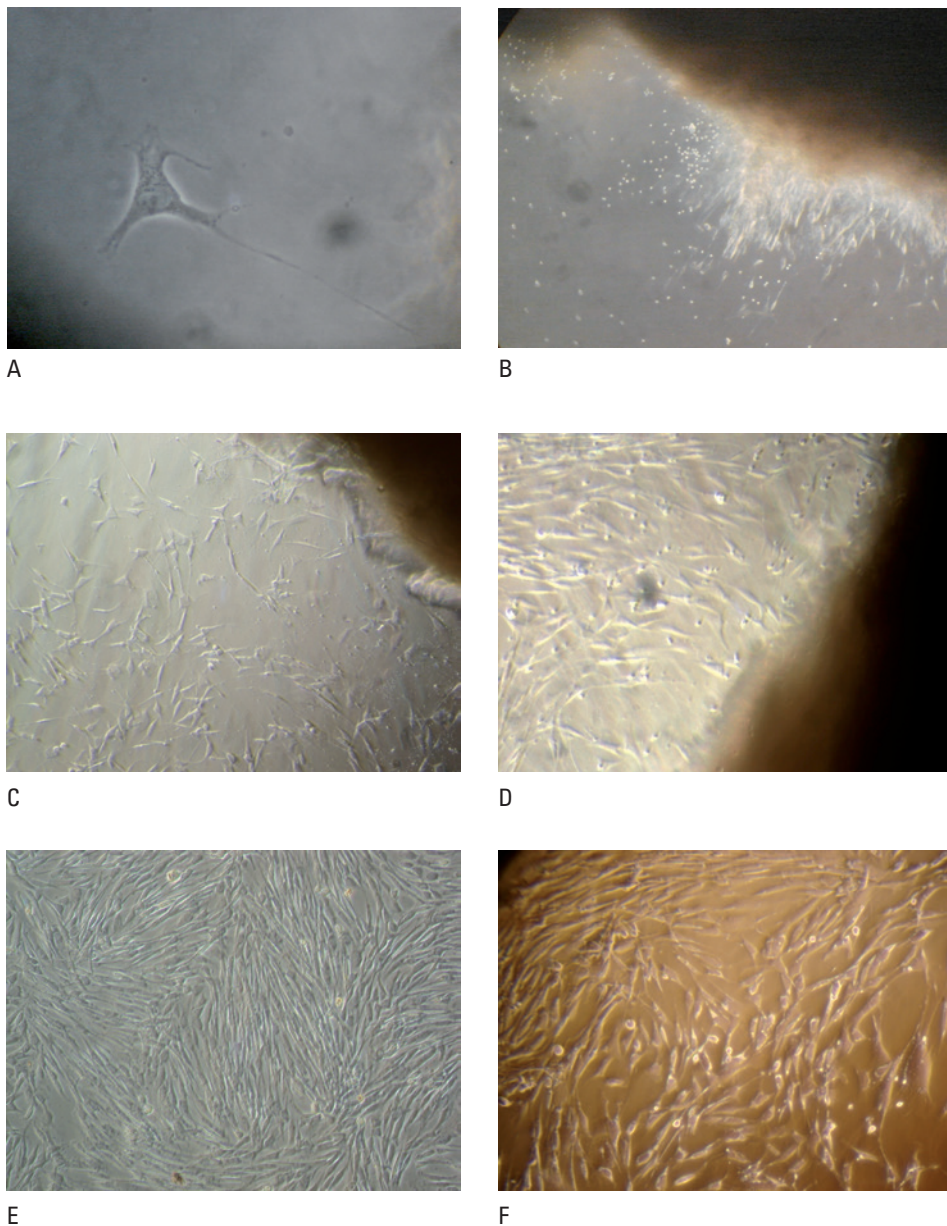
A partir del cDNA obtenido por RT, se determinó la expresión del mRNA con la técnica PCR en tiempo real usando el termociclador LightCycler<sup>®</sup> de Roche y la metodología de detección de SYBR<sup>®</sup> green (Invitrogen). Los anteriores procedimientos se realizaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Para evaluar la expresión del marcador LPL se desarrollaron los cebadores específicos diseñados con el programa Primer3 a partir de las secuencias de este gen reportadas en el GenBank (Tabla 2).

La especificidad de los productos obtenidos fue confirmada con las curvas de disociación. La expresión de GAPDH canino, fue empleado como gen normalizador para comparar la expresión génica de los marcadores osteonectina, colágeno tipo I y lipoproteín lipasa. De manera adicional se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 5%, teñida con bromuro de etidio, para verificar el tamaño de todos los productos obtenidos por qRT-PCR.

### **Análisis estadístico**

Los niveles de expresión de los genes CD73, colágeno tipo I, osteonectina y lipoproteín lipasa (LPL) fueron analizados por una prueba paramétrica *t de Student*. Se compararon las mediciones de los niveles de expresión génica arrojados por el análisis del programa del LightCycler. Para evidenciar el nivel de expresión de los genes específicos en el tiempo de inducción, se



**FIGURA 1.** Aspecto morfológico en cultivo celular monocapa de MSCs caninas a partir de tejido adiposo. **A.** Morfología fibroblastoide de una célula en cultivo (100x). **B.** Cuarto día después de iniciar el cultivo: se observan células fibroblastoides contiguas al explante (10x). **C.** Séptimo día de cultivo: se observan células proliferando hacia la periferia (10x). **D.** Décimo día de cultivo (40x). **E.** Dos semanas de cultivo (15 días): se observa una población de MSCs con morfología homogénea y una confluencia del 80-90% (10x). **F.** Células dos días después de la tripsinización, en su primer pasaje (40x).

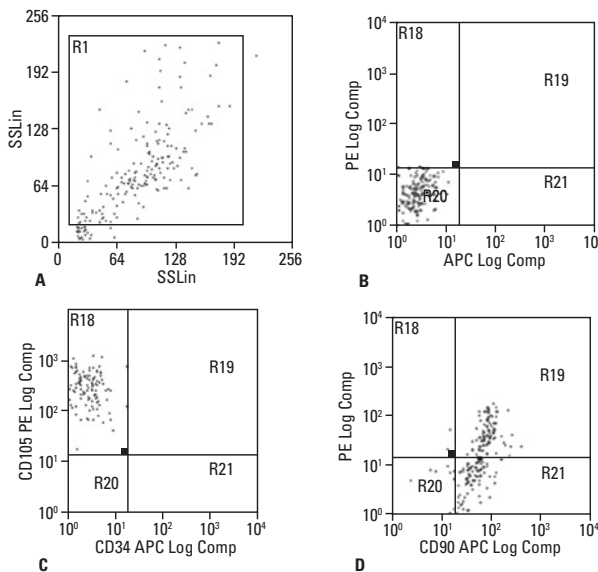
compararon los resultados entre la primera y segunda semanas, y entre la segunda y tercera semanas. En todos los análisis se utilizó un nivel de significancia menor de 0.05 ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias estadísticas significativas. El análisis de los datos se realizó con el programa Excel®.

**RESULTADOS**

**Establecimiento del cultivo de ad-MSCs**

El cultivo celular se estableció a partir de los explantes durante los primeros 15 días (Figura 1). Los cultivos primarios obtenidos presentaron características morfológicas propias de estas células, con morfología fibroblastoide (Figura 1A) similares entre

sí, de tamaño uniforme, fusiformes, pequeñas que varían en la extensión de sus prolongaciones (Figuras 1B y 1C). Entre el séptimo y décimo día del aislamiento celular (Figuras 1C y 1D) fue evidente la uniformidad del cultivo celular, con una población homogénea en la cual se apreció un fenotipo derivado del explante a través del tiempo como se pudo apreciar a los 10 días de cultivo (Figura 1D) y que se hizo más notorio a los 15 días (Figura 1E). Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia de 80% se realizó el primer subcultivo. Durante los cultivos subsecuentes se observó un fenotipo estable con predominio de células fibroblastoides las cuales se cultivaron con los medios de diferenciación. Con un mayor número de pasajes



**FIGURA 2.** Caracterización celular de ad-MSCs por citometría de flujo. El fenotipo de las células indiferenciadas y adherentes fue determinado por citometría de flujo. Se usaron como controles, células MSCs en cultivo sin marcar, células mononucleares de sangre periférica y los isotipos correspondientes a cada fluorocromo. La definición de las regiones que limitan el positivo del negativo se realizó a partir de los controles utilizados. **A.** Población celular en la que se realizó el estudio (SS, FS). **B.** Controles negativos para cada marcador FITC y APC. **C.** CD105, marcador que identifica las células mesenquimales (Eje Y) y CD34, marcador que identifica las células de linaje hematopoyético (Eje X). **D.** CD90, marcador positivo para células madre mesenquimales (Eje X).



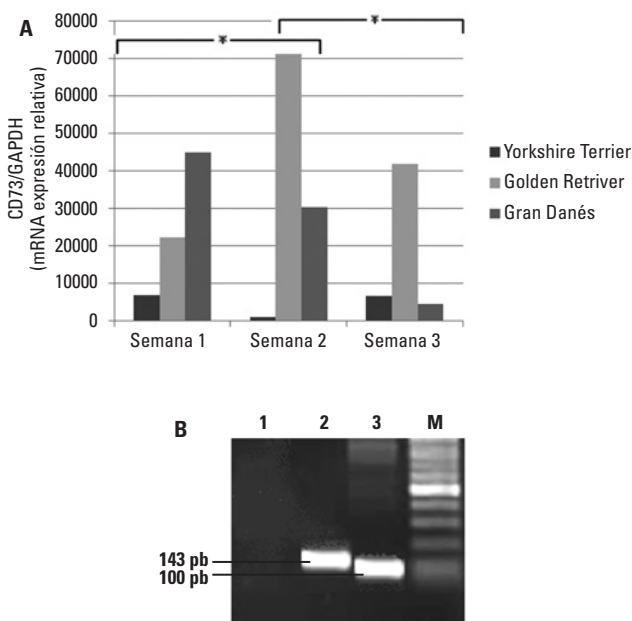
(pase 2 al 6), se siguieron conservando las características morfológicas descritas (Figura 1F). En los 15 días siguientes a la siembra del explante, hubo células de morfología fibroblastoide, adherentes al plástico y contiguas al explante de tejido adiposo (Figuras 1A y 2B).

**Evaluación de determinantes antigénicos por citometría de flujo**

El fenotipo de las células aisladas fue determinado en una fase temprana del cultivo celular, específicamente en el pasaje dos. Las células obtenidas no presentaron el antígeno de superficie CD34 (0%) correspondiente al linaje hematopoyético, mientras que presentaron un porcentaje

de células positivas para los antígenos de superficie CD105 (98.51%) y CD90 (75%) (Figura 2).

Respecto de la expresión del mRNA con el marcador CD73, como control de amplificación se evidenciaron los ampli-cones de las amplificaciones de CD73 y GAPDH en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 3B). El gen CD73 se expresó en los cultivos no sometidos a medios de diferenciación evaluados durante el tiempo del exper-imento; sin embargo, se observaron variaciones en los niveles de expresión en cada uno de los caninos. Las células del canino de la raza Yorkshire Terrier mostraron una reducción de la expre-



**FIGURA 3.** Niveles de expresión de mRNA de CD73 en los cultivos de ad-MSCs. **A.** La expresión de mRNA de CD73 fue evaluada con PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los niveles de CD73 se normalizaron con los niveles del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa canino (cGAPDH) seleccionado como control endógeno. Se compararon las mediciones realizadas entre la primera y segunda semana, y entre la segunda y tercera semana (\*  $P > 0.05$ ). **B.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio: se empleó un marcador de peso molecular (M); línea 1: control negativo de la reacción; línea 2: CD73 (143 pb); línea 3: GAPDH (100pb).

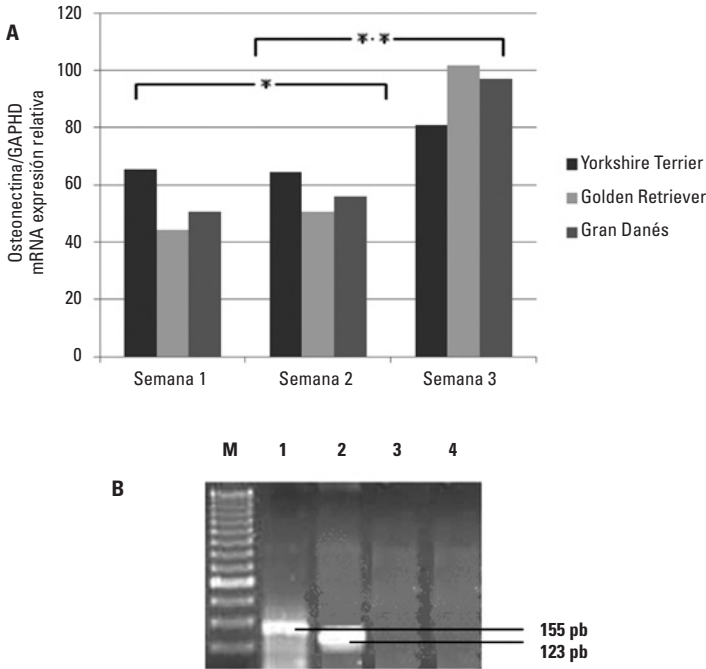
sión del CD73 en la segunda semana de cultivo, mientras que las células del Golden Retriever aumentaron notablemente el nivel de expresión. En las células del Gran Danés la expresión se fue reduciendo durante el transcurso del ensayo. En ninguna de las mediciones se observó una ausencia total de expresión de CD73. Al comparar las mediciones entre la primera y segunda semana no se observaron diferencias estadísticas significativas. De igual forma no hay diferencias significativas entre las mediciones realizadas en la segunda y tercera semana ( $P > 0.05$ , Figura 3A).

### Diferenciación en linajes mesodérmicos

Todas los cultivos mostraron la adquisición del fenotipo y genotipo buscado por los medios de inducción.

### Diferenciación en linajes osteogénicos

Se evaluó la visualización de los amplicones de colágeno tipo I y osteonectina, en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 4B). La expresión del gen de osteonectina se presentó en todos los cultivos incubados con el medio de inducción de osteogénesis. En todos los



**FIGURA 4.** Niveles de expresión de mRNA de osteonectina en los cultivos de ad-MSCs. **A.** La expresión de mRNA de osteonectina fue evaluada con PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los niveles de osteonectina se normalizaron con los niveles del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), seleccionado como control endógeno. Se compararon las mediciones realizadas entre la primera y segunda semana, y entre la segunda y tercera semana. (\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ ). **B.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio: se empleó un marcador de peso molecular (M); línea 1: colágeno tipo I (155pb); línea 2: osteonectina (123 pb); líneas 3 y 4: células control.

cultivos se presentó un nivel similar de la expresión de osteonectina entre la primera y la segunda semana de inducción, así como un aumento significativo en la tercera semana de cultivo. Comparativamente, hubo una diferencia a entre las mediciones realizadas entre la segunda y tercera semana de inducción ( $P < 0.05$ , Figura 4A).

La expresión relativa de mRNA del gen de colágeno tipo I se hizo respecto a la cantidad de mRNA del gen constitutivo GAPDH (Figura 5).

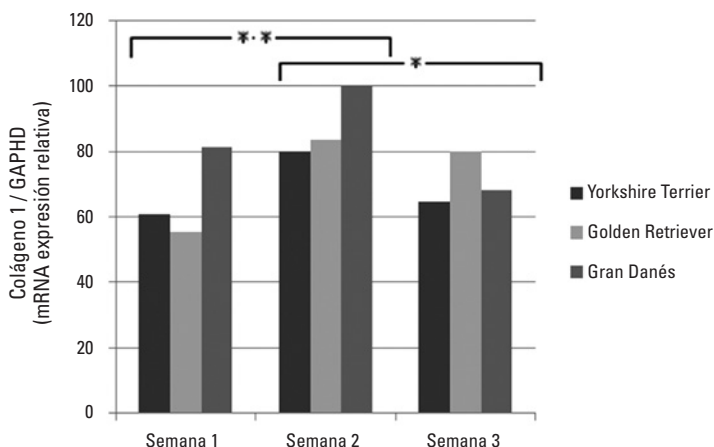
Los niveles de expresión de colágeno de tipo I aumentaron de la primera a la segunda semana de inducción, con una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ , Figura 5). En la tercera semana aunque se observa un descenso en la expresión de este gen, no hay diferencias significativas que indiquen la pérdida de la expresión de colágeno tipo I. Las células que no se

cultivaron en medios inductores, no mostraron amplificación de los marcadores de diferenciación. Estas células constituyeron el control negativo durante las tres semanas de inducción.

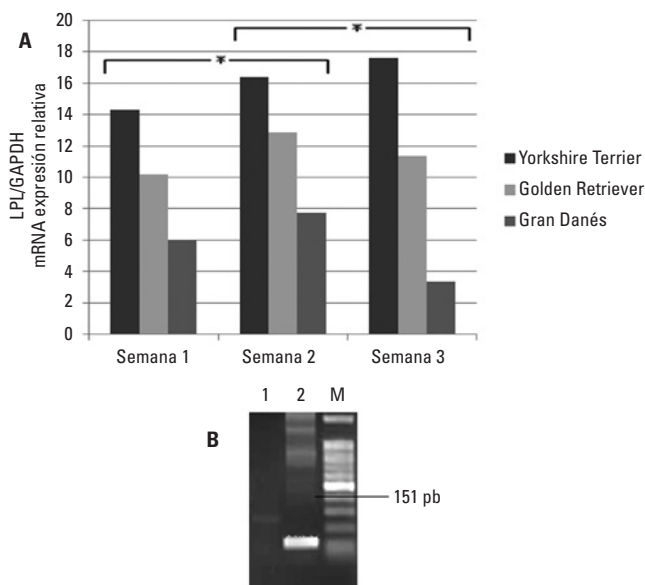
El perfil de expresión de osteonectina y colágeno tipo I de las células incubadas en el medio de cultivo inductivo, indica la adquisición del fenotipo osteoblástico.

### Diferenciación de linajes adipogénicos

La capacidad de diferenciación adipogénica se determinó por la formación de vacuolas lipídicas intracelulares que corresponden a la formación de depósitos de triglicéridos evidentes por la tinción Oil Red O (resultado no mostrado). Los fragmentos amplificados se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6B).



**FIGURA 5.** Niveles de expresión de mRNA de colágeno tipo I en los cultivos de ad-MSCs. La expresión de mRNA de colágeno tipo I fue evaluada con PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los niveles de colágeno tipo I se normalizaron con los niveles del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), seleccionado como control endógeno. Se compararon las mediciones realizadas entre la primera y segunda semanas, y entre la segunda y tercera semanas. (\*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ ).



**FIGURA 6.** Niveles de expresión de mRNA de LPL de los cultivos de ad-MSCs. **A.** La expresión de mRNA de LPL fue evaluada con PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los niveles expresión del gen LPL se normalizaron con los niveles del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), seleccionado como control endógeno. Se compararon las mediciones realizadas entre la primera y segunda semanas, y entre la segunda y tercera semanas (\*  $P > 0.05$ ). **B.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio: se empleó un marcador de peso molecular (M); línea 1: células control; línea 2: LPL (151 pb).

En las curvas de disociación hay incremento de la expresión de LPL en la segunda semana de inducción en las ad-MSCs de los tres caninos, que declina ligeramente hacia la tercera semana, excepto por las ad-MSCs del Yorkshire terrier, donde el nivel de expresión aumenta ligeramente. No hubo diferencias estadísticas significativas en las mediciones de expresión del LPL entre la primera y segunda semana de inducción, así como tampoco en las mediciones realizadas entre la segunda y tercera semana ( $P > 0.05$ , Figura 6A). Las células cultivadas sin inductores de adipogénesis, no presentaron expresión de LPL en las mediciones semanales del mRNA. Las células cultivadas adquirieron el fenotipo adipogénico por la actividad constante de LPL durante el todo tiempo de inducción.

## DISCUSIÓN

Se determinó que se puede obtener durante cirugía abdominal de rutina, tejido adiposo subcutáneo de la pared abdominal de caninos, procedimiento que es superior a la liposucción como lo reportaron Vieira y Reich en caninos (Reich *et al.* 2012; Vieira 2010) y Zuk en seres humanos (Zuk *et al.* 2002). La metodología del explante directo resulta óptima, observándose una expansión del cultivo, en contraste con los métodos de digestión enzimática que reportan otros estudios en caninos (Reich *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2010), equinos (Del Blue *et al.* 2008) y humanos (Choi *et al.* 2011; Nakagami *et al.* 2006; Schaffler y Buchler 2007; Zuk *et al.* 2002). En el presente estudio la recuperación de las ad-MSCs caninas fue del 100% (3/3),

en contraste con el estudio de Beltrán, en seres humanos que también empleó la metodología del explante directo, cuya recuperación fue del 80%, (Beltrán, 2007).

Igual a lo reportado por Guercio *et al.* (2013) quienes dicen que no se ha reportado que la edad del perro influya directamente sobre la capacidad de diferenciación de ad-MSCs, en el presente estudio tampoco se reportó diferencia en los caninos de 2, 3 y 6 años.

Las células obtenidas de tejido adiposo canino presentaron morfología fibroblastoide, adherencia al plástico, continuidad en cultivo cumpliendo con el primer criterio de la ISCT, lo que se asemeja a las células mesenquimales obtenidas de médula ósea canina (Calloni *et al.* 2014; Hodgkiss-Geere *et al.* 2012; Huss *et al.* 2000; Reich *et al.* 2012) y a las células mesenquimales de médula ósea humana (Colter *et al.* 2001; Lee *et al.* 2006; Pittenger *et al.* 1999; Song *et al.* 2004; Tuli *et al.* 2003).

El presente estudio estableció la expresión de marcadores propios de células madre mesenquimales según los criterios de la ISCT. Mediante medición por citometría de flujo se evidenció que había expresión del marcador CD90 en 75.4% de las células de segundo pasaje, lo cual se acerca al resultado obtenido por Vieira *et al.* (2010) y Reich *et al.* (2012), que reportaron 87% y 94.8% en caninos, respectivamente. Por su parte, Kang (2008) también reporta la expresión de un 99.63% en células de 4º. pasaje para el mismo marcador. Probablemente el origen de la muestra de tejido adiposo, su posterior tratamiento enzimático de los otros estudios y el pasaje adelantado de los mismos sean factores determinantes en una menor expresión de CD90. El marcador CD105 se expresa en 98.51%, lo que es

consistente con lo exigido por la ISCT sobre el perfil de expresión de las MSCs y con el resultado obtenido por Takemitsu (2012) por citometría de flujo en células de médula ósea y tejido adiposo canino.

El marcador CD73, en los estudios de Vieira *et al.* (2010) y Takemitsu (2012), se manifestó el 1% y el 3.8%, respectivamente, mediante la metodología de citometría de flujo. En el presente estudio se evaluó la expresión de CD73 a través de la medición de niveles de mRNA, el cual se presentó en las células aisladas durante tres semanas de cultivo en el medio sin factores de inducción, en los tres animales. Llama la atención que Vieira *et al.* trabajaron sólo con perros de raza Golden Retriever, y en el presente estudio en el cual está incluido un perro de esta raza, la expresión génica fue evidente también en las razas Yorkshire Terrier y Gran Danés. Otro aspecto que podría tenerse en cuenta es la metodología empleada. En todos los estudios usaron la citometría de flujo para la presentación del marcador de superficie celular. En nuestro ensayo evaluamos la expresión génica evidenciando la transcripción del gen CD73 a mRNA, la cual se presentó en todas las células. La presencia de este marcador coincide con reportes de MSCs de médula ósea humana (Hung *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006) y de tejido adiposo humano (Schaffler y Buchler 2007; Zuk *et al.* 2002).

Las ad-MSCs obtenidas en el presente estudio no presentaron expresión del marcador CD34, al igual que las MSCs aisladas de médula ósea canina del estudio de Hodgkiss-Geere (2012), en el cual también se empleó la citometría de flujo para su medición. En MSCs humanas también se reporta ausencia de marcadores de linaje hematopoyético en aislamientos de tejido adiposo (Beltrán 2007; Zuk *et*

*al.* 2002) y de médula ósea (Chen *et al.* 1997; Hung *et al.* 2002; Tuli *et al.* 2003).

CD34 es un antígeno asociado a progenitores hematopoyéticos en el humano. Es una glicoproteína integral de membrana que regula la adhesión de las células madre hematopoyéticas al estroma en humanos (Satterthwaite *et al.* 1992). En caninos, la descripción del antígeno CD34 se ha realizado en los últimos años por McSweeney (1998) y se ha logrado identificar en estudios sobre progenitores en médula ósea (Huss *et al.* 2000; Niemeyer *et al.* 2001). Las células madre mesenquimales comprenden una población diferente a las células hematopoyéticas; por lo tanto, no presentan marcadores de superficie de este linaje celular. Este es uno de los criterios de la ISCT para la caracterización de MSCs (Dominici *et al.* 2006; Horwitz *et al.* 2005).

En el presente estudio, las células aisladas tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia los linajes mesodérmicos osteogénico y adipogénico, lo que evidenció, una vez más, su naturaleza como células madre mesenquimales, al igual que las MSCs obtenidas en otras especies en las cuales se demostró la capacidad de diferenciación como en felinos (Calloni *et al.* 2014; Martin *et al.* 2002), bovinos (Calloni *et al.* 2014; Bosnakovski *et al.* 2005) y seres humanos (Reyes y Verfaillie 2001); las MSCs de caninos expresan de marcadores de linajes celulares y cambios morfológicos (Requicha *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2010).

La detección de marcadores de osteonectina (Figura 4) y colágeno tipo I (Figura 5), demuestra que la diferenciación osteoblástica se presentó en las células con medio de cultivo de inducción. Con el medio inductivo de osteogenesis, aumentó la presencia de mRNA de osteonectina en la tercera semana de inducción (Figura

4A) indicando el aumento de células que presentaban la activación del gen de osteonectina, como marcador tardío de la maduración ósea. Igualmente Vieira *et al.* (2012), midió a los 5 días de cultivo en medio de inducción, los marcadores osteopontina y colágeno tipo I. El presente trabajo corrobora el de Vieira *et al.* (2012) en la expresión de colágeno tipo I desde la primera semana de inducción. El reporte de expresión de osteopontina y osteonectina en dicho trabajo, establece la adquisición del fenotipo osteoblástico de las MSCs derivadas de tejido adiposo canino, y se demuestra que *in vitro* las ad-MSCs siguieron una secuencia de maduración y cambio, similar al proceso que se desarrolla en el organismo.

Los osteoblastos tienen tres estadios de maduración en donde hay síntesis de diferentes componentes orgánicos con la activación sucesiva de una serie de genes. En la proliferación y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea hay producción de colágeno tipo I. En los cultivos de ad-MSCs con el medio inductivo de osteogénesis, la presencia de mRNA del colágeno tipo I fue evidente desde la primera semana de inducción, con aumento significativo en su expresión en la segunda semana (Figura 5A) a causa de una mayor activación del gen de colágeno tipo I. En la fase de mineralización, después de la maduración de la matriz ósea, hay una producción continua de osteonectina, relacionada con la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. (Kraus *et al.* 2006; Minamide *et al.* 2007).

La expresión de estos marcadores de expresión osteoblástica en MSCs también se ha reportado en diferentes especies: MSCs de tejido adiposo en humanos (Beltrán 2007; Zuk *et al.* 2002); en MSCs de médula ósea humana (Chen *et al.* 1997;

Hung *et al.* 2002; Tuli *et al.* 2003); en MSCs de médula ósea bovina (Bosnakovski *et al.* 2005) y en MSCs de médula ósea murina (Peister *et al.* 2004).

La posible adquisición de características osteoblásticas *in vivo*, similar a lo que ocurre *in vitro*, aporta perspectivas alentadoras que permitirían aprovechar su potencial de restauración tisular, como se demostró en caninos con lesiones en el cráneo con la administración directa de MSCs acompañadas de matrices como hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TPC) (Bruder *et al.* 1998; Umeda *et al.* 2007).

Morfológicamente las células mostraron cambios durante el tiempo de cultivo. Inicialmente presentaron morfología fibroblastoide, pero adquirieron una forma poligonal desde la primera semana de cultivo, así como la demostración de depósitos de calcio y mineralización de la matriz a través de tinciones histoquímicas (resultados no mostrados). Este resultado también es concordante con los criterios de la ISCT y lo publicado en ad-MSC caninas por Requicha *et al.* (2010) y Vieira *et al.* (2012).

La diferenciación adipogénica se comprobó por la expresión del gen de lipoproteín lipasa (LPL) y la adquisición de un fenotipo diferente en cultivo. La lipoproteín lipasa (LPL) es una enzima que desempeña un papel fundamental en el metabolismo lipídico a través de la hidrólisis de los triglicéridos transportados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Durante este proceso se liberan ácidos grasos que pueden ser re-esterificados bajo la forma de triglicéridos para ser almacenados, tal como sucede en el tejido adiposo. En este sentido, la LPL actúa como un mediador importante en el mantenimiento de la homeostasis energética y la acumulación

de la grasa en el tejido adiposo en el organismo. A nivel intracelular se forman vacuolas ricas en triglicéridos las cuales, en las ad-MSCs en estudio, se hicieron evidentes y estuvieron desde la primera semana. Fueron positivas para la tinción de Oil Red O trascurridas tres semanas de inducción (resultados no mostrados). La LPL se expresa principalmente en los tejidos adiposo y muscular. Por lo tanto, su expresión indica diferenciación celular a linaje adipogénico en las MSCs aisladas. No se halló ninguna diferencia estadística significativa entre las mediciones realizadas a lo largo de tres semanas de inducción (Figura 6); sin embargo, la expresión de LPL se apreció desde la primera semana de cultivo, al igual que el cambio morfológico de las células. Vieira (2012) también reporta la expresión de LPL desde la primera semana de cultivo con el correspondiente cambio morfológico de las células, las cuales presentaban formación de vacuolas intracelulares que se teñían con Oil Red O. Sin embargo también midieron otros marcadores como Leptina y FABP4 que complementan el estudio de este cambio. Debe quedar claro que, aunque el tejido original del cual se recuperaron las MSCs es el adiposo, se demostró que las células recuperadas son células indiferenciadas por su morfología fibroblastoide y la ausencia de alguno de los marcadores de diferenciación adipogénica, lo cual se comprobó puesto que células no diferenciadas fueron usadas como control negativo.

Se ha reportado la expresión de LPL en MSCs obtenidas de médula ósea humana (Quintero *et al.* 2005; Rim *et al.* 2005; Song y Tuan 2004), murina (Peister *et al.* 2004) y en MSCs de tejido adiposo humano (Beltrán 2007; Zuk *et al.* 2002).

## CONCLUSIONES

Se estableció una metodología para aislamiento y cultivo de células estomales o mesenquimales provenientes de tejido adiposo canino (ad-MSCs), que se identifican de acuerdo con parámetros fenotípicos y funcionales, y representan una fuente disponible de células madre mesenquimales de fácil acceso, dada su amplia distribución corporal en caninos y aún en otras especies.

Aunque el presente estudio no evaluó el efecto del origen anatómico del tejido adiposo, un estudio reciente muestra mejores resultados del tejido adiposo de cavidad abdominal con un evidente efecto en el potencial de diferenciación de las MSCs (Requicha *et al.* 2012).

Las células aisladas tienen capacidad de diferenciación a dos linajes celulares de tejidos mesodérmicos, osteogénico y adipogénico, comprobándose de esa forma la multi-potencialidad de las MSCs.

Las ad-MSCs cultivadas tuvieron un perfil de expresión de moléculas marcadoras de membrana típico de las MSCs: CD105+, CD90+, CD34-, evaluado por citometría de flujo y confirmación de la presencia de CD73+ mediante qRT-PCR.

El tejido adiposo es una fuente de células *stem* (estomales), que tiene ventaja sobre otras fuentes por ser de fácil accesibilidad, obteniéndose en grandes cantidades con procedimientos poco invasivos, lo que representa una herramienta potencial para el tratamiento de diversas patologías, tanto en el campo de la medicina veterinaria, como en el de la medicina humana.

Esta investigación en MSCs es la primera que se realiza en el país en caninos y brinda perspectivas para su eventual aplicación en tratamientos en medicina regenerativa.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación (DIB) de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto.

## REFERENCIAS

- Alfonso Z, Fraser J, Benhaim P. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13:4279-4295.
- Aust L, Devlin B, Foster S, Halvorsen YD, Hicok K, du LT, Sen A, Willingham GD, Gimble JM. 2004. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytoterapy.* 6:7-14.
- Aziz Aly LA, Menoufy HE, Ragae A, Rashed LA, Sabry D. 2012. Adipose stem cells as alternatives for bone marrow mesenchymal stem cells in oral ulcer healing. *Int J Stem Cells.* 5(2):104-114.
- Beltrán O. 2007. Expresión de factores angiogénicos en células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo en condiciones de normoxia e hipoxia. [Tesis de maestría]. [Bogotá, Colombia] Universidad Nacional de Colombia.
- Black LL, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams AE, Taylor R, Harman S, Gingerich DA, Harman R. 2008. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Vet Ther.* 3:192-200.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 319(2):243-253.
- Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J, Penning, LC. 2006. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem.* 356:36-43.
- Bruder S, Jaiswal N, Ricalton N, Mosca J, Kraus K, Kadiyala S. 1998. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop.* 355(4):247-256.
- Calloni R, Viegas GS, Türck P, Bonatto D, Pegas JA. 2014. Review mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. *Cytotherapy.* 16: 3-16.



- Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS. 2002. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol.* 20: 245-256.
- Chen JL, Hunt P, Mc. Elvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES. 1997. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 15:368-377.
- Choi SA, Hwang SK, Cho B, Phi JH, Lee JY, Jung HW, Lee DH, Kim SK. 2011. Therapeutic efficacy and safety of TRAIL producing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against experimental brainstem glioma. *NeuroOncol.* 13 (1): 61-69.
- Colter D, Sekiya I, Prockop J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *PNAS.* 98 (14):7841-7845.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 174: 101-109.
- Del Blue M, Riccò S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S. 2008. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association *in vitro* and *in vivo*. *Vet Res Commun.* 32:51-55.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 315-317.
- Fridestein A, Chailakhjan R, Lalykina K. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tiss Kinet.* 3(4): 393-409.
- Fridestein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 4:267-274.
- Fridestein A, Chailakhjan R, Lalykina K. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell tissue Kinet.* 3(4): 393-409.
- Fridestein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 4:267-274.
- Gimble JM, Guilak F. 2003a. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 5: 362-369.
- Gimble JM, Guilak F. 2003b. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Devy Biol.* 58:137-160.
- 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.
- 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(8):789-798.
- Hodgkiss-Geere HM, Argyle DJ, Corcoran BM, Whitelaw B, Milne E, Bennett D, Argyle SA. 2012. Characterization and cardiac directed differentiation of canine adult cardiac stem cells. *Vet J.* 191: 176-182.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(13):8932-8937.
- Hung S, Chen N, Hsieh S, Li H, siao-Li, Ma H, Loa W. 2002. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 20:249-258.
- Huss R, Lange C, Weissinger E, Kolb H, Thalmeiera K. 2000. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34-/low hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells.* 18:252-260.
- Jafarian MM, Baghaban M, Khojasteh A, Abbas FM, Dehghan MM, Hassanizadeh R, Houshmand B. 2008. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic

- calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med O.* 105:14-24.
- Jun C, Yaoming N, Lu W, Zhiui Z, Yao Q, Changai Z, Zhiyuan S. 2011. Experimental research: Isolation of canine bone marrow mesenchymal stem cells by a novel method. *Heart.* 97: suppl 3.
- Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. 2008. Soluble factors-mediated Immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17:681-694.
- Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H. 2005. Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS). *Stem Cells.* 23:412-423.
- Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung D, Park HM. 2013. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol.* 24: 242-253.
- Kraus KH, Kirker-Head C. 2006. Review: Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 35:232-242.
- Lee J, Wecker A, Losordo DW, Yoon YS. 2006. Derivation and characterization of bone marrow derived multipotent stem cells. *Exp Hematol.* 34: 1602-1603.
- Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol.* 30:879-886.
- Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F. 2011. Canine adipose-derived mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci.* 91:18-24.
- McSweeney PA, Rouleau KA, Wallace PM, Bruno B, Andrews RG, Krizanag-Benges L, Sandmaier BM, Storb R, Wayner E, Nash RA. 1998. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. *Blood.* 91: 1977-1986.
- McIntosh K, Zvonjc S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di HY, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. 2006. The immunogenicity of human adipose derived cells: Temporal changes *in vitro*. *Stem Cells.* 24:1246-1253.
- Minamide A, Yoshida M, Kawakami M, Okada M, Enyo Y, Hashizume H, Boden S. 2007. The effect of bone morphogenetic protein and basic fibroblast growth factor on cultured mesenchymal stem cells for spine fusion. *Spine.* 32: 1067-1071.
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonjc S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di HY, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stroma-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 24:376-385.
- Nakagami H, Morishita M, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. 2006. Adipose tissue derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb.* 13:77-81.
- Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop Jr CD. 2001. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 29: 686-693.
- Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago MA. 2004. Marrow-derived mesenchymal stem cells comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone. *Stem Cells.* 22:1263-1278.
- Peister A, Mellad J, Larson B, Hall B, Gibson L, Prockop D. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 103(5):1662-1668.
- Pittenger M, Mackay A, Beck S. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284(5411):143-147.
- Prockop D. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues. *Science.* 276:71-74.
- Quintero L, Beltrán O, Chaparro O. 2005. Expresión de citoquinas y factores de crecimiento en células *stem* mesenquimales humanas obtenidas a partir de médula ósea. En: Memorias día de la investigación; 2005. Fundación Cardioinfantil, Bogotá, D.C.
- Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S. 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal

- stem cells: A comparative study. *Vet Res Commun.* 36:139-148.
- 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 Cells Rev Rep.* 8(4):1211-1222.
- Reyes M., Verfaillie CM. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 938: 231-233.
- Rim JS, Mynatt RL, Gawronska-Kozak BG. 2005. Mesenchymal stem cells from the outer ear: A novel adult stem cell model system for the study of adipogenesis. *Faseb J.* 19:1205-1207.
- Rodríguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie.* 87:125-128.
- Santoscoy C, Hernández M. 2005. Diplomado a distancia en medicina, cirugía y zootecnia en perros y gatos. En: *Módulo 9 - Ortopedia.* 2ª. ed. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México. p. 213-228.
- Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. 1992. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics.* 12:788-794.
- Schaer M. 2006. *Medicina clínica del perro y el gato.* 1ª ed. Barcelona: Masson Elsevier. p. 578.
- Schaffler A, Buchler C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 25: 818-827.
- Schutze N, Noth U, Schneider J, Hendrich C, Jakob F. 2005. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Comm Signal.* 3:1-12.
- Song L, Tuan RS. 2004. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J.* 10:1-15.
- 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. doi:10.1186/1746-6148-8-150.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. 2003. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* 21: 681-693.
- Umeda H, Kanemaru S, Yamashita M, Kishimoto M, Tamaura Y, Nakamura T, Omori K, Hirano S, Ito J. 2007. Bone repair of canine skull using bone marrow-derived stromal cells and  $\beta$ -Tricalcium phosphate. *Laryngoscope.* 117(6): 997-1003.
- 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.
- Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N. 2004. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol.* 32: 657-664.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso Z, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13: 4279-4295.

### Article citation:

Riaño NB, Vera, VJ. 2014. Aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación de células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo [Isolation, characterization and potential differentiation of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue]. *Rev Fac Med Vet Zoot.* 61(2):115-133.