



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE PROLIFERACIÓN,
MULTIPOTENCIALIDAD E INMUNOLÓGICAS DE LAS
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ESPECIES
DOMÉSTICAS**

KEVIN MATÍAS YANESELLI GONZÁLEZ

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2019**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE PROLIFERACIÓN,
MULTIPOTENCIALIDAD E INMUNOLÓGICAS DE LAS
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ESPECIES
DOMÉSTICAS**

KEVIN MATÍAS YANESELLI GONZÁLEZ

Dra. Jacqueline Maisonnave
Directora

Dra. Silvia Llambí
Co-directora

Dra. Clementina Rodellar
Co-directora

2019

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Dr. Uruguaysito Benavides
Profesor Adjunto, Área Inmunología
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

Dra. Cristina Touriño
Profesor Agregado, Depto Básico de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de la República

Dr. Francisco Vázquez
Profesor Asociado
Depto Patología Animal Servicio de Cirugía y Medicina Veterinaria
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza

ACTA DEL TRIBUNAL



FACULTAD DE VETERINARIA Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE PROLIFERACIÓN, MULTIPOTENCIALIDAD E INMUNOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ESPECIES DOMÉSTICAS

Por: KEVIN MATÍAS YANESELLI GONZÁLEZ

Directora de Tesis: Dra. Jacqueline Maisonnave
Codirectoras de Tesis: Dra. Silvia Llambí
Dra. Clementina Rodellar

Tribunal

Presidente: Dr. Uruguaysito Benavides

Segundo Miembro: Dra. Cristina Touriño

Tercer Miembro: Dr. Francisco José Vázquez

Fallo del Tribunal: APROBADA CON MENCIÓN

Montevideo, 13 de agosto de 2019

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

INFORME DEL TRIBUNAL



PROGRAMA DE POSGRADOS

En nombre mío y del Tribunal consideramos que el Dr. Kevin Yaneselli González ha realizado una excelente Tesis titulada: **“Estudio de las características de proliferación, multipotencialidad e inmunológicas de las células madre mesenquimales de especies domésticas”**

El tema de la tesis del Dr. Yaneselli es muy importante e innovador, que permite solucionar algunos problemas de la salud animal que no presentaban solución hasta el momento.

El Dr. Yaneselli detectó el problema, de la necesidad de profundizar sobre los mecanismos de regeneración tisular e inmunomodulación de las células madres mesenquimales (MSCs) para comenzar el uso terapéutico de esta tecnología innovativa en medicina veterinaria en nuestro país. El objetivo general planteado de la tesis fue profundizar en diferentes características de las MSCs en tres especies de animales domésticos: caninos, equinos y felinos.

La Tesis presentó una muy actualizada revisión bibliográfica, con objetivos claros, una metodología adecuada que le permitieron obtener resultados claros, e innovativos, los cuales fueron discutidos adecuadamente contra la información presente en las publicaciones internacionales.

En resumen, el Dr. Yaneselli desarrolló métodos y protocolos de aislamiento, caracterización y criopreservación de MSCs de la especie canina, equina y felina.

Asimismo, describió por primera vez a nivel mundial el perfil inmunogénico e inmunomodulador de las células madres mesenquimales obtenidas de médula ósea (BM-MSCs) de equinos.

Además, demostró que mediante el uso de lisado plaquetario concentrado (CPL) durante la obtención de las BM-MSCs, éstas adquieren un perfil similar al inducido en un contexto proinflamatorias *“in vitro”* a diferencia de aquellas cultivadas con lisado plaquetario basal normal no concentrado (BPL) o suero fetal bovino (FBS). En los estudios realizados en felinos, caracterizó y criopreservó células madres derivadas de tejido adiposo (AD-MSCs).

En caninos aisló y caracterizó a las MSCs, comparó las características de las MSCs provenientes de sitios anatómicos diferentes y evaluó el efecto sitio y pasaje celular sobre la multipotencialidad *in vitro* de las MSCs.

Para finalizar el Dr. Yaneselli plantea que sería de gran importancia continuar profundizando en el conocimiento de las características de las MSCs que aseguren un uso terapéutico seguro y eficaz, en especial su potencial inmunomodulador y de qué manera se pueden optimizar las condiciones *in vitro* previo al tratamiento.

La Tesis doctoral del Dr. Yaneselli es una clara contribución al conocimiento de la tecnología de las células madres en medicina veterinaria en Uruguay y en el mundo por lo cual merece mis más sinceras felicitaciones

Sin más los saluda atentamente

Uruguaysito Benavides. DMTV, DBC, PhD
Presidente del Tribunal

DEDICATORIA

Este trabajo me llevó años de esfuerzo, aprendizaje, disfrute y también como fruto del mismo la contribución a la comunidad científica, se lo dedico enteramente a mi familia y novia, la cual, me apoyó desde el inicio de esta larga trayectoria que empezó en 2007, cuando pisé por primera vez la Facultad de Veterinaria, y no sabía que iba encontrar este lindo camino, es decir, el de una carrera académica. En especial, se la dedico a mi padre y madre por enseñarme todo lo que hay que saber para salir adelante y que siempre el esfuerzo, compromiso, constancia, que a veces hay que decir “no” a algunas cosas para decir “sí” a otras, al final del camino te llenan de satisfacción, realización y plenitud.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia y a mi novia por entender los viajes, ausencias y en cierta medida transformarse obligadamente en “especialistas” de células madre porque han asistido sistemáticamente a mis defensas de tesis previa a ésta.

A mi tutora, la Dra. Jacqueline Maisonnave por iniciarme en la investigación, despertar esa curiosidad científica en mí. Además, de motivarme a partir mar adentro sin saber que puerto puedo encontrar, o si realmente existe un puerto, pero así es la ciencia, hay que adentrarse en el desconocimiento para generar nuevo conocimiento.

A la Dra. Silvia Llambí por aceptar ser mi co-tutora de tesis de maestría y ahora en la presente tesis doctoral, siempre una excelente guía en lo académico y personal acompañando mi proceso de formación.

A la Dra. Clementina Rodellar por aceptar ser mi co-tutora, la cual, muy amablemente me permitió realizar experimentos en su laboratorio, integrarme a su grupo de trabajo, guiarme académicamente, y hacerme sentir como en casa a pesar de estar en otro continente. Además, quiero agradecer a las investigadoras Dras. Laura Barrachina y Ana Rosa Remacha por todo su apoyo en los experimentos y en la redacción del Manuscrito IV.

A todos mis compañeros del Departamento de Ciencias Microbiológicas por el apoyo incondicional para realizar el presente trabajo, en especial al equipo del Área Inmunología, integrada por los siguientes docentes el Dr. Uruguaysito Benavides y la Dra. Agustina Algorta. Además, a todos los investigadores/docentes que de alguna manera estuvieron vinculados en algún aspecto a este trabajo.

Por último, a los integrantes del tribunal por brindarme su tiempo y conocimientos para generar un ambiente de debate científico en la defensa y aportar sus comentarios y sugerencias para aumentar la calidad científica de este trabajo.

Listado de Abreviaturas

AD-MSCs	<i>Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
ATB	<i>Antibiótico</i>
BDVD	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BM-MSCs	<i>Bone marrow derived mesenchymal stem cells</i>
bp	<i>Base pair</i>
BPL	<i>Basal concentration platelet lysate</i>
B2M	<i>beta2-microglobulin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CFU-F	<i>Colony forming units-fibroblastic</i>
COLIA	<i>Collagen type I $\alpha 1$</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CPL	<i>Concentrated platelet lysate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DT	<i>Cell doubling times</i>
eBM-MSCs	<i>equine bone marrow derived mesenchymal stem cells</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ESCs	<i>Embryonic stem cells</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GEE	<i>Generalized estimating equations</i>
GMP	<i>Good manufacturing practices</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen – DR isotype</i>
HSCs	<i>Haematopoietic stem cells</i>
IDO	<i>indoleamine 2, 3-dioxygenase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
INF- γ	<i>Interferon gamma</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
iPSCs	<i>Induced of pluripotent stem cells</i>
ISCT	<i>International Society of Cellular Therapy</i>
MEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MO	<i>Médula ósea</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium</i>
MSCs	<i>Mesenchymal stem cells/mesenchymal stromal cells/mesenchymal stromal/stem cells</i>
NF	<i>Normalization factor</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
Osx	<i>Osterix</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandin E2</i>
PL	<i>Platelet lysate</i>
PRP	<i>Plasma rico en plaquetas</i>
PrPSc	<i>Prion protein scrapie isoform</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

RT-qPCR	<i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
Sc	Subcutánea
TA	Tejido adiposo
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
Vs	Visceral
vs	<i>Versus</i>
WBC	<i>White blood cell</i>
$\Delta\Delta Ct$	<i>Delta-delta threshold cycle</i>

Listado de Cuadros

Cuadro I: Criterios para la definición de diferentes medios de cultivo.....12

Cuadro II. Resumen de ventajas y desventajas del suero fetal bovino (FBS) vs lisado plaquetario (PL) para el cultivo de células madre mesenquimales (MSCs).....14

Listado de Figuras

Figura 1. Esquema de la clasificación de las células madre por su capacidad de diferenciación.....4

Figura 2. Esquema de la terapia celular con células madre mesenquimales (MSCs).6

ÍNDICE

ACTA DEL TRIBUNAL.....	I
INFORME DEL TRIBUNA.....	II
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Listado de Abreviaturas.....	V
Listado de Cuadros.....	VII
Listado de Figuras.....	VIII
ÍNDICE.....	IX
RESUMEN.....	XI
SUMMARY.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Células madre.....	1
1.2 Células madre mesenquimales.....	2
1.3 Relevancia terapéutica de las células madre en Medicina Veterinaria.....	4
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	7
2.1 La médula ósea y el tejido adiposo como principales fuentes de MSCs.....	7
2.2 Multipotencialidad de las MSCs.....	7
2.3 Aspectos inmunológicos de las MSCs.....	9
2.4 Suero fetal bovino “ <i>gold standard supplement</i> ”.....	10
2.5 Desarrollo de medio libre de componentes xenogénicos.....	12
3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
4.1 Hipótesis.....	16
4.2 Objetivos.....	16
4.2.1 Objetivo general.....	16
4.2.2 Objetivos específicos.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Animales.....	17
5.2 Aislamiento y propagación <i>ex vivo</i> de las MSCs.....	17
5.2.1 Extracción de tejido adiposo.....	17
5.2.2 Extracción de médula ósea.....	18
5.2.3 Aislamiento de MSCs.....	18
5.3 Proliferación celular.....	18

5.3.1 Tiempo de duplicación celular.....	18
5.3.2 Ensayo de MTT.....	19
5.4 Caracterización de las MSCs.....	19
5.4.1 Inmunofenotipo.....	19
5.4.2 Unidades formadoras de colonias fibroblastoides.....	19
5.4.3 Tridiferenciación <i>in vitro</i>	20
5.5 Cuantificación de matriz ósea <i>in vitro</i>	20
5.6 Perfil inmunogénico e inmunomodulador.....	20
5.7 Viabilidad celular post-criopreservación.....	20
5.8 Análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6.1 Presentación de los trabajos y justificación de la unidad temática.....	22
6.2 Manuscrito I.....	23
6.3 Manuscrito II.....	30
6.4 Manuscrito III.....	39
6.5 Manuscrito IV.....	47
6.6 Discusión general.....	67
6.6.1 Caracterización <i>in vitro</i> de las MSCs en condiciones estándar.....	67
6.6.2 Inmunofenotipificación de las MSCs en condiciones estándar.....	67
6.6.3 Caracterización <i>in vitro</i> de las MSCs cultivadas con PL alogénico.....	68
6.6.4 Perfil inmunológico de las MSCs cultivadas con PL como suplemento.....	70
7. CONCLUSIONES GENERALES.....	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSCs) presentan gran interés en veterinaria por su potencial uso en medicina regenerativa. Los caninos, equinos y felinos tienen un rol protagónico en veterinaria como animales de compañía y como atletas. Además, las especies domésticas son valiosos modelos animales para los humanos. Existe la necesidad de profundizar sobre los mecanismos de regeneración tisular e inmunomodulación de las MSCs para contribuir a la evolución del uso terapéutico, debido a la menor información sobre estas características en animales domésticos en comparación a las de origen humano. El objetivo general planteado en la presente tesis fue profundizar en diferentes características de las MSCs en tres especies de animales domésticos: canina, equina y felina. Se plantearon diferentes objetivos específicos según la especie doméstica: a) Canina: aislar y caracterizar a las MSCs, comparar las características de las MSCs provenientes de sitios anatómicos diferentes y evaluar el efecto sitio y pasaje celular sobre su multipotencialidad *in vitro*; b) Equina: aislar y caracterizar a las MSCs y evaluar el uso del lisado plaquetario (PL) alogénico como suplemento de cultivo sobre la capacidad proliferativa, multipotencialidad y su perfil inmunogénico e inmunomodulador; c) Felina: aislar y caracterizar a las MSCs. Para ello, se extrajeron muestras de tejido adiposo (TA) o de médula ósea (MO) para el aislamiento de MSCs (AD-MSCs y BM-MSCs, respectivamente) a un total de 10 caninos, 11 equinos y 6 felinos, y para conformar el pool de PL equino se extrajo sangre de la vena yugular a un total de 6 equinos adultos. Se realizó la propagación *ex vivo*, prueba de unidades formadoras de colonia fibroblastoides (CFU-F), prueba de tridiferenciación *in vitro* de las MSCs en condiciones estándar para las tres especies. Para la inmunofenotipificación de MSCs caninas y equinas se determinaron los marcadores a través de citometría de flujo o su expresión génica por RT-qPCR, respectivamente. En el caso de caninos se evaluó la capacidad osteogénica *in vitro* comparando diferentes fuentes de MSCs como la proveniente de TA subcutánea (Sc) y visceral (Vs) y también a lo largo de consecutivos pasajes celulares. Por otro lado, se reemplazó el suero fetal bovino (FBS) por el PL alogénico con diferente concentración plaquetaria, basal (BPL) y concentrado (CPL), en el cultivo de MSCs equinas provenientes de TA y MO, se evaluó la cinética de crecimiento *in vitro* a través de la determinación del tiempo de doblaje (DT) y la prueba de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en diferentes pasajes celulares. La evaluación del perfil génico de inmunogenecidad e inmunomodulación de las MSCs equinas cultivadas con los nuevos suplementos BPL y CPL se evaluó a través de la RT-qPCR. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: a) Caninos: se observó un perfil inmunofenotípico similar para las fuentes Sc y Vs de AD-MSCs. Por otro lado, se observó que los pasajes celulares sucesivos tuvieron un efecto negativo sobre la multipotencialidad *in vitro* de las AD-MSCs de ambas fuentes. Asimismo, se observó que las AD-MSCs Sc presentaron capacidad de tridiferenciación *in vitro* con mayor longevidad de pasajes celulares y una mayor capacidad de formación de matriz ósea *in vitro* en comparación a las de origen Vs; b) Equinos: fue posible cultivar AD-MSCs y BM-MSCs con BPL como suplemento de medio. Mostraron una similar cinética de crecimiento en sucesivos pasajes cuando las células eran cultivadas con BPL en comparación al FBS, además de conservar su multipotencialidad *in vitro* para el caso evaluado con AD-MSCs. Por otro lado, cuando se determinó cinética de proliferación de las BM-MSCs cultivadas con CPL se observó una mayor capacidad proliferativa que BPL. Se describió por primera vez el perfil inmunogénico e inmunomodulador de las BM-MSCs cultivadas con CPL y BPL, observado que las células en la condición CPL

adquieren un perfil con un leve aumento de los marcadores inmunogénicos e inmunomoduladores; c) Felino: fue posible aislarlas, caracterizarlas y criopreservar AD-MSCs. Evidenciando que presentaron adherencia al plástico, capacidad clonogénica y multipotencialidad *in vitro*. En conclusión, fue posible el aislamiento, caracterización y criopreservación de MSCs de la especie canina, equina y felina. Para caninos las AD-MSCs de origen Sc presentaron capacidad de tridiferenciación *in vitro* con mayor longevidad de pasajes celulares y una mayor capacidad de formación de matriz ósea *in vitro* en comparación a las de origen Vs. Para equinos fue posible cultivar y propagar *ex vivo* con BPL como suplemento de medio cultivo a AD-MSCs y BM-MSCs. Asimismo, se ha descrito por primera vez el perfil inmunogénico e inmunomodulador de las BM-MSCs equinas y se observó que en la condición CPL adquieren un perfil similar al inducido en un contexto proinflamatorias *in vitro* a diferencia de aquellas cultivadas con BPL o FBS. Para felinos fue posible aislar, caracterizar y criopreservar a las AD-MSCs. Por último, sería de gran importancia continuar profundizando el conocimiento de las características de las MSCs que aseguren un uso terapéutico seguro y eficaz, en especial su potencial inmunomodulador y de qué manera se pueden optimizar las condiciones *in vitro* previo al tratamiento.

SUMMARY

The increasing interest of mesenchymal stem cells (MSCs) in veterinary science is due to their regenerative properties. Canines, equines and felines have an important role as companion animals and athletes. In addition, domestic animals are good models for humans. In veterinary medicine, there is less knowledge on the regenerative and immunomodulation characteristics of MSCs, than in humans. Therefore, the need of increasing studies on these characteristics, on domestic species, in order to contribute to the evolution of the therapeutic use of MSCs. The objective of this thesis was to increase the study on different characteristics of the MSCs of domestic animals: canines, equines and felines. a) Canines: isolate and characterize MSCs, extracted from different anatomical sites. Evaluate the effect of adipose tissue site extraction and passage number, on *in vitro* MSCs multipotentiality. b) Equines: isolation, characterization and evaluation of the use of allogenic platelet lysate (PL) as supplement on the expansion, proliferation, multipotentiality, immunogenic and immunomodulation characteristics of MSCs. c) Felines: isolate and characterize of MSCs. Adipose tissue or bone marrow samples were extracted from: 10 canines, 11 equines and 6 felines. A blood sample from six adult horses was taken from the jugular vein for preparing the pooled PL. *Ex vivo* propagation, determination of colony forming units-fibroblastic (CFU-F) and *in vitro* MSCs tridifferentiation, were performed in all three species. Immunophenotyping of canine and equine MSCs, for detection of surface markers or their gene expression, was performed, by flow cytometry and RT-qPCR, respectively. *In vitro* osteogenic capacity of canine MSCs, along passages, were evaluated in subcutaneous (Sc) and visceral (Vs) adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs). In addition, when fetal bovine serum (FBS) was substituted by allogenic equine PL, at different concentrations, basal (BPL) and concentrated (CPL), on equine AD-MSCs and bone marrow derived MSCs (BM-MSCs) cultures, *in vitro* growth kinetics was evaluated by doubling time (DT) and by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, at different cellular passages. The immunogenic and immunomodulatory profile of equine MSCs cultured with the new supplements, BPL and CPL, were RT-qPCR evaluated. Results: a) Canines: similar immunophenotypic profiles were observed for Sc and Vs AD-MSCs. On the other hand, successive passages of AD-MSCs of both sources had a negative effect on *in vitro* multipotentiality. In addition, Sc AD-MSCs, showed increased capacity for *in vitro* tridifferentiation on higher passages and bigger osteogenic matrix capacity, when compared to Vs; b) Equines: It was possible to grow AD and BM-MSCs with BPL supplement. Similar cellular growth kinetics in successive passages when the cells were cultured with BPL compared to FBS, in addition to retaining their *in vitro* multipotentiality for the case evaluated with AD-MSCs. Successive passages of BM-MSCs supplemented with CPL showed greater proliferative capacity to BPL supplementation. For the first time, the immunogenic and immunomodulation profile of BM-MSCs cultured with CPL and BPL was described. Equine MSCs cultured with CPL, slightly increased immunogenic and immunomodulation markers; c) Feline AD-MSCs cells were isolated, characterized and cryopreserved. They showed adherence to plastic, capacity of clonal growth and *in vitro* multipotentiality. In conclusion, it was possible to isolate, characterize and cryopreserve MSCs of canine, equine and feline species. Canine Sc AD-MSCs showed capacity of *in vitro* tridifferentiating during higher passage numbers and had greater capacity to form *in vitro* bone matrix, compared to Vs origin. It was possible to culture and *ex vivo* propagate BPL supplemented equine AD-MSCs and BM-

MSCs. Immunogenic and immunomodulation profile of equines BM-MSCs, was described for the first time, and the cells under the CPL condition acquired a similar profile as the ones in a pro-inflammatory environment, contrary to the ones cultured with BPL or FBS. It was possible to isolate, characterize and cryopreserve feline AD-MSCs. It would be very important to continue investigating, especially the immunomodulation potential of MSCs and other *in vitro* propagation conditions, in order to assure a safe and efficacious therapeutic use.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Células madre

Las células madre mejor conocidas en la literatura internacional como *stem cells* pertenecen a un grupo especial de células que tienen la capacidad de diferenciarse de manera asimétrica y poseen una alta capacidad de autorrenovación en su estado indiferenciado. Esto quiere decir, que son capaces de diferenciarse en una célula comprometida con un linaje adulto y/o otras células madre indiferenciada, de esta manera son capaces de mantener el pool de células madre y también promover el desarrollo embrionario-fetal, el mantenimiento de un individuo adulto y/o modular la regeneración tisular (Dulak et al., 2015). Dentro de la gran cantidad de células madre descritas podemos encontrar dos grandes grupos según el estadio de desarrollo de un individuo, embrionarias y adultas, y por manipulación *in vitro* se incorpora un grupo llamado células madre pluripotentes inducidas (*induced of pluripotent stem cells: iPSCs*) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

En primer lugar, las células madre embrionarias (*embryonic stem cells: ESCs*) aparecen en los primeros estadios de la vida de un individuo. Estas células se pueden obtener a partir de la fertilización de los gametos óvulo-espermatozoide, evento que precede a la formación de una célula huevo y posterior conformación de más de 250 tipos celulares que se van a especializar para conformar un individuo adulto, y sin perder la capacidad de autorrenovación ilimitada *in vitro*. Dentro de las ESCs vamos a encontrar las células totipotentes, lo que quiere decir que tiene la capacidad de dar origen a los linajes celulares del ectodermo, endodermo y mesodermo de las capas embrionarias y además de sus anexos embrionario. Este linaje tan especial, solo se consigue en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Una vez que va avanzando el desarrollo embrionario las ESCs van paulatinamente perdiendo potencialidad de diferenciación, y se convierten en células pluripotentes, las cuales son capaces de dar origen a células de los tres linajes embrionarios, pero no así a los anexos embrionarios como las totipotentes, y debido a sus características existe gran interés en ellas para su uso médico y biotecnológico (Chou et al., 2015; Bošković et al., 2014).

En segundo lugar, tenemos a las células madre adultas (*adult stem cells*) las cuales pueden obtenerse de diversos tejidos de un individuo o también provenientes de los anexos embrionarios. Estas células se caracterizan por presentar una limitada capacidad de autorrenovación *in vitro* y una capacidad de diferenciación reducida teniendo la capacidad de originar tipos celulares especializados principalmente del linaje de ascendencia embrionaria, por ejemplo del ectodermo, endodermo o mesodermo, por ello son conocidas como células multipotentes (Dulak et al., 2015). Dentro de este gran grupo de células en la presente tesis abordaremos en profundidad las células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells: MSCs*) las cuales provienen del mesodermo y principalmente dan origen a células derivadas de ese origen como adipocitos, condrocitos, osteocitos y miocitos (Bourin et al., 2013; Dominici et al., 2006). Sin embargo, se ha descrito que en las MSCs existe el fenómeno de transdiferenciación *in vitro* debido que en determinadas condiciones es posible dirigir la diferenciación a linajes no mesenquimales como por ejemplo células tipo neuronales (Luo et al., 2018), pero no se da espontáneamente *in vivo*. Asimismo, existen las células progenitoras unipotentes las cuales son capaces de dar origen solo a un tipo de célula especializada como células satélites de músculo esquelético o piel (Dulak et al., 2015).

En tercer lugar, aparecen las iPSCs desarrolladas gracias a la ingeniería genética que consiguió “reprogramar” el compromiso de una célula adulta especializada y devolverle su pluripotencialidad embrionaria, como las ESCs. Esto marcó un hito científico en el conocimiento de las células madre y el potencial de desarrollo biotecnológico. En el trabajo de Takahashi e Yamanaka (2006) describen por primera vez iPSCs de origen murino, a partir de fibroblastos consiguieron reprogramar las células gracias a la utilización de estos factores de transcripción c-Myc, Klf4, Oct4 y Sox2. Este hecho abrió la puerta a muchas investigaciones como modelos de enfermedades, prueba de drogas y desarrollo de gametos *in vitro* que hasta el momento estaban limitadas debido que para trabajar con las ESCs se requería la extracción de embriones y/o fetos, lo que implicaba graves problemas éticos, religiosos, de bienestar animal y el riesgo de generación de teratomas (Kim et al., 2009; Zhu et al., 2012; Xu et al., 2013; Kondo et al., 2018).

1.2 Células madre mesenquimales

Las MSCs presentan las características generales de las células madre adultas, es decir limitada capacidad de autorrenovación *in vitro* y multipotencialidad (Bourin et al., 2013). La primera descripción registrada de estas células fue hecha al trasplantar médula ósea (MO) a nivel subcapsular renal encontraron osificación de dicho tejido, lo que indicaba que existía una subpoblación diferentes a las células madre hematopoyéticas (*haematopoietic stem cells*: HSCs) (Petrakova et al., 1963), posteriormente gracias a los trabajos de Friedenstein *et al.* (Friedenstein et al., 1974, 1970) en los cuales se consiguió aislar una población celular que denominaron “*fibroblast precursors*” con capacidad de formar colonias fibroblastoides (*colony forming units-fibroblastic*: CFU-F) por su adherencia y capacidad clonogénica *in vitro*, además describieron que ellas son capaces de conservar su poder osteogénico luego de ser expandidas *in vitro*. Años más tarde, en el trabajo de Caplan (1991) se postuló que estas células diferentes a las HSCs deberían ser células madre derivadas del mesodermo y por ello las denominó como “*mesenchymal stem cells*”, este trabajo marcó un punto de inflexión hasta la actualidad debido a que fue adoptada su nomenclatura en miles de artículos científicos. Por último, ante la problemática del correcto uso de la terminología surgió de la comunidad científica una serie de criterios para comprobar que las células obtenidas de la MO son MSCs, la *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) postuló unos mínimos requisitos que deben cumplir para poder ser denominadas “*multipotent mesenchymal stromal cells*” y así uniformizar su nomenclatura. Para ello, las células mesenquimales aisladas de MO deben cumplir con los siguientes requisitos: adherencia al plástico, presentar los siguientes marcadores de superficie CD90, CD73, CD105 y la ausencia de CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR, y la capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteocitos *in vitro* (conocida como prueba de tridiferenciación *in vitro*). Estas recomendaciones son aplicadas para células humanas, en cambio para células de otras especies como las de animales domésticos, los marcadores de superficie no se considera un criterio esencial debido a la variabilidad interespecie, desconocimiento de marcadores específicos y/o poca disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos para células no humanas (Dominici et al., 2006). Muchos autores coinciden en la necesidad de definir unos criterios que permitan estandarizar las MSCs en especies domésticas, por ejemplo, para las células de la especie equina se ha descrito que no cumplen todos los criterios establecidos por la ISCT (Paebst et al., 2014).

Luego de más de tres décadas de su descubrimiento la comunidad científica experimenta dificultades en el empleo de una adecuada nomenclatura, lo que se ve reflejado en la literatura utilizando diferentes significados para MSCs, pero sin cambiar su abreviatura/acrónimo. Los ítems encontrados en los último 5 años según el buscador de PubMed para el término *mesenchymal stromal cells* son 29.181, para *mesenchymal stem cells* son 27.836 y para *mesenchymal stromal/stem cells* solo 456 (PubMed, 2019). Estas cifras nos muestran que a pesar de existir una intención de uniformizar la nomenclatura ya hace más de una década con el trabajo de Dominici et al. (2006) aún se siguen usando y aceptando diferentes terminologías para hablar de las MSCs, por ello en la presente tesis se utilizarán indistintamente.

Luego de la descripción de MO como fuente de MSCs (*bone marrow derived MSCs*: BM-MSCs) en la década del 70 comenzaron a surgir otros trabajos en los cuales consiguieron aislar MSCs de diferentes tejidos de individuos adultos de los que se destaca el tejido adiposo (TA) (Zuk et al., 2001) conocidas como *adipose tissue-derived MSCs* (AD-MSCs), músculo esquelético (Čamernik et al., 2018), pulpa dentaria (Kawashima et al., 2017) entre otras fuentes. Asimismo, pueden ser obtenidas de anexos embrionarios como la matriz de cordón umbilical (Kong et al., 2019) y también la sangre proveniente del mismo (Mohamed et al., 2019), membrana y líquido amniótico (Rossi et al., 2012; Graham and Fauza, 2015).

Su nomenclatura ha sido polémica, a partir propuso denominarlas “*mesenchymal stem cells*” en la década del 90 (Caplan, 1991), surgieron diversas publicaciones que adoptaron esta nomenclatura sin existir un consenso si es realmente adecuado denominarlas de “*stem cells*”, por ello, la ISCT divulga una serie de criterios que se deben cumplir y así uniformizar su nomenclatura. En 2006 las denomina “*multipotent mesenchymal stromal cells*” (Dominici et al., 2006) y luego en el año 2013 proponene denominarlas “*mesenchymal stromal/stem cells*” (Bourin et al., 2013). En controversia, el propio Caplan después de 26 años de aquella publicación que impacto en toda la comunidad científica, propone cambiarle su nombre oficial a “*Medicinal Signaling Cells*” debido a que sería un nombre más adecuado por su efecto terapéutico. Actualmente, se sabe que su potencial terapéutico está dado en gran parte a la capacidad de modular la regeneración tisular y a el sistema inmune a través de moléculas bioactivas e interacción célula-célula y no tanto por su capacidad de diferenciarse en tejido adulto y reemplazar el lesionado (Caplan, 2017). Entonces, la aplicación de estos criterios no asegura que realmente se tengan *stem cells* debido que no se comprueba a largo plazo la diferenciación asimétrica, pero si nos permite estandarizar su producción *in vitro*.

Por último, luego de mencionar las principales características de las células madre y terminología a continuación para facilitar la comprensión se confeccionó un esquema que ilustra la clasificación, potencialidad y su utilidad científica conocida hasta el momento (Fig. 1).

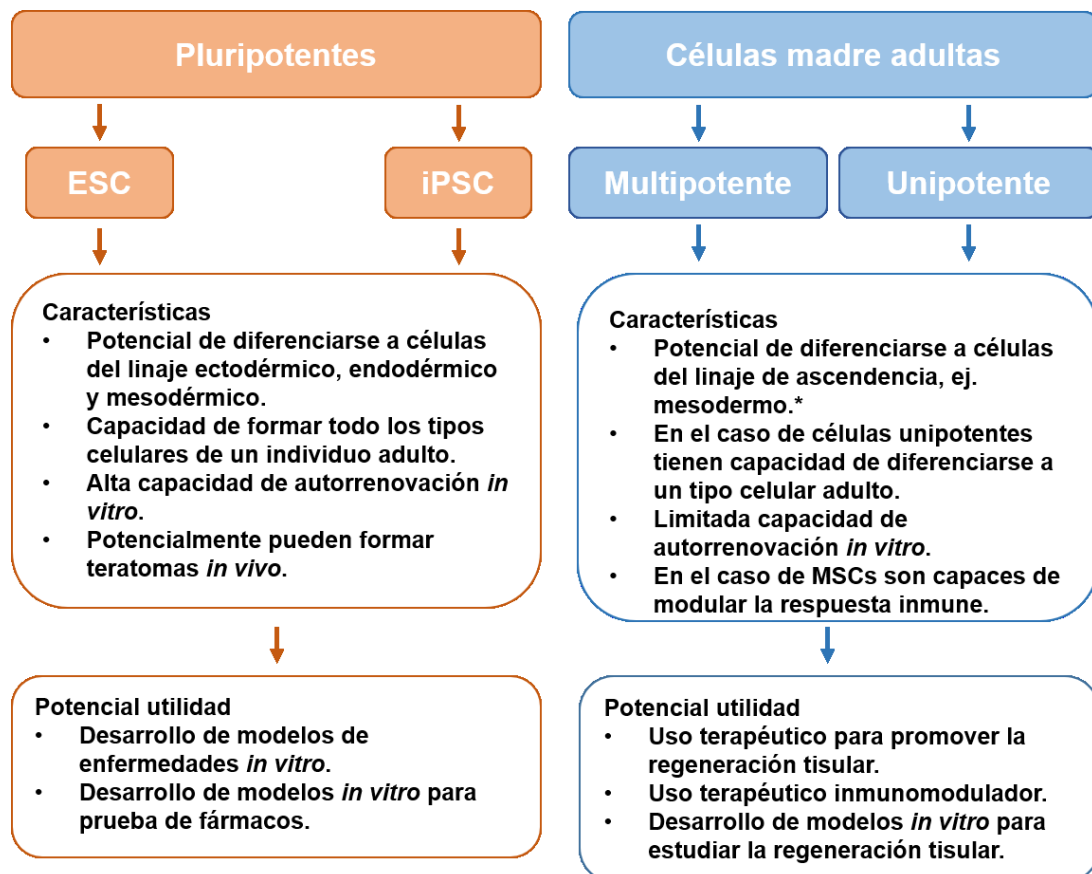


Fig. 1. Esquema de la clasificación de las células madre por su capacidad de diferenciación. Se mencionan principales características, utilidades terapéuticas y biotecnológicas conocidas en la actualidad. *existe el fenómeno de transdiferenciación *in vitro* de las MSCs en células del linaje ectodérmico (Song et al., 2019) y también del endodérmico (Sawitza et al., 2015).

1.3 Relevancia terapéutica de las células madre en Medicina Veterinaria

Las MSCs presentan gran interés en veterinaria por su potencial uso en medicina regenerativa especialmente en las especies canina, equina y felina debido a que tienen un rol protagónico en medicina veterinaria como animales de compañía y en el caso de los equinos también como atleta de actividades hipicodeportivas. Asimismo, las especies domésticas son valiosos modelos animales para los humanos, debido a las similares características anatomofisiológicas, homologías de patologías genéticas humanas, vida longeva y pueden ser sometidos a períodos de rehabilitación posteriores a la terapia celular, sumando fortalezas al uso de modelos animales no tradicionales (Marx et al., 2015; Hillmann et al., 2016). Actualmente, en el desarrollo de nuevas terapias en medicina regenerativa presentan gran importancia los modelos animales de especies domésticos, siempre demostrando que existe una necesidad real para utilizar animales en el experimento llevado a cabo. Los experimentos con animales deben asegurar que se use el mínimo número de animales y asegurar su bienestar, utilizando métodos alternativos cuando sea posible. Los métodos alternativos, deben cumplir el “principio de las tres Rs” que suponen: reducción, refinamiento y reemplazo. Sumado a que es importante resaltar la iniciativa de Una Salud (del inglés *One Health*), con un pensamiento amplio de que las ciencias médicas y veterinarias convergen en salvaguardar la salud, y la interconexión de las investigaciones médicas y veterinarias podrían tener un efecto sinérgico favoreciendo el avance del conocimiento de la patogénesis de diversas

afecciones y fortaleciendo el conocimiento colectivo interdisciplinario (Volk and Theoret, 2013; One Health Initiative, 2019).

Es importante conocer a través de qué mecanismo las MSCs logran tener un efecto terapéutico. Inicialmente, se hipotetizó que al poseer multipotencialidad *in vitro* se repetiría *in vivo* una vez aplicadas las MSCs y de esta manera serían capaces de reemplazar el tejido lesionado por nuevo tejido igual al original y no cicatrizal. Esto, tenía su lógica ya que las HSCs tienen un comportamiento similar y son capaces de repoblar la MO por ejemplo en casos de leucemias (Kumar and Geiger, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que una vez aplicadas la mayoría de las MSCs sobreviven un corto periodo de tiempo en el huésped y en el tejido lesionado es infrecuente encontrar una célula adulta especializada derivada de las MSCs inoculada artificialmente (Gupta et al., 2007; Iso et al., 2007). Contradictoriamente, la evidencia científica mostraba que poseían un efecto terapéutico beneficioso cuando eran aplicadas en diversas patologías (Volk and Theoret, 2013). Finalmente, se determinó que los principales mecanismos de acción de las MSCs eran del tipo paracrina y de contacto intercelular que permiten disminuir el daño, modular la regeneración tisular, es decir a las células madre/progenitoras del tejido lesionado y al sistema inmune, lo que explica su efecto terapéutico, pero se ha descrito en varios casos un efecto transitorio. Las actividades tróficas destacadas se pueden mencionar: 1) inhibir la apoptosis y fibrosis; b) estimular la angiogénesis; c) estimular reclutamiento, retención, proliferación y diferenciación a células específicas del tejido injuriado o de los progenitores y/o células madre intrínsecas del huésped (Strioga et al., 2012).

En caninos existen reportes de casos clínicos en los cuales se aplicaron MSCs en la zona de lesión y existió una adecuada resolución de la fractura, no unión, osteomielitis con retorno de los procesos osteogénicos y retorno funcional del miembro afectado (Yaneselli et al. 2013; Semiglia et al. 2014; Dora et al., 2015). Las patologías neurológicas son afecciones graves e irreversibles en muchos casos, debido a que el tejido nervioso posee una escasa regeneración. Entonces, cuando existe daño a nivel de cerebro y/o médula espinal se presenta pérdida sensorial y motora irreversible. Se ha descrito un efecto beneficioso de las MSCs sobre lesiones de médula espinal, la aplicación de células a nivel intratecal en la zona lesionada muestra un mejoramiento de los animales tratados con retorno funcional y sensorial parcial, lo cual es un gran avance, ya que los tratamientos tradicionales generalmente no consiguen estos avances (Besalti et al., 2016; Escalhão et al., 2017; Wu et al., 2018).

En equinos las lesiones tendinosas son frecuentes, en especial sobre el tendón flexor digital superficial. La cicatrización normal no consigue regenerar el tendón con la resistencia y elasticidad original, lo que se traduce en mayor proporción de recidivas y menor retorno a la actividad deportiva (Dowling et al., 2010). En cambio, se ha descrito que la aplicación de MSCs sobre lesiones tendinosas promueve una mejor calidad de la regeneración, un tipo y orientación adecuado de fibras colágenas, para darle una similar resistencia y elasticidad al tendón original (Nixon et al., 2008). Estos efectos beneficiosos se traducen en mayor retorno a las actividades hipicodeportivas y disminución de las recidivas (Pacini et al., 2007). Cuando se compara el potencial terapéutico de las BM-MSCs, AD-MSCs y plasma rico en plaquetas (PRP) sobre tendinitis inducidas se muestra que los tres tratamientos presentan un efecto claramente positivo cuando se comparan con el control. De los tres tratamientos, las BM-MSCs resultaron ser más efectivas (Romero et al., 2017). Otra patología tratada con MSCs son las osteoartritis debido que la aplicación interarticular promueve la regeneración de matriz cartilaginosa y disminuye la

progresión degenerativa debido a su poder inmunosupresor y a su capacidad de diferenciación (Broeckx et al., 2014). Efectos beneficiosos han sido observados en el tratamiento de esta patología, sobre todo a corto plazo (Barrachina et al. 2018).

En la especie felina, se ha comenzado a estudiar la utilización de MSCs como tratamiento alternativo en algunas patologías crónicas y de pronóstico reservado como: enfermedad renal crónica (Quimby and Dow, 2015), enteropatía crónica (Webb and Webb, 2015), asma crónico felino (Trzil et al., 2014) y gingivostomatitis crónica (Arzi et al., 2016). Los resultados han sido prometedores observando un efecto beneficioso, lo que motiva a fortalecer su estudio.

Por último, la sumatoria de evidencias científicas ha demostrado el enorme potencial que poseen las MSCs con fines terapéuticos en medicina veterinaria, en la Figura 2 se ilustra las principales estrategias de terapia celular.

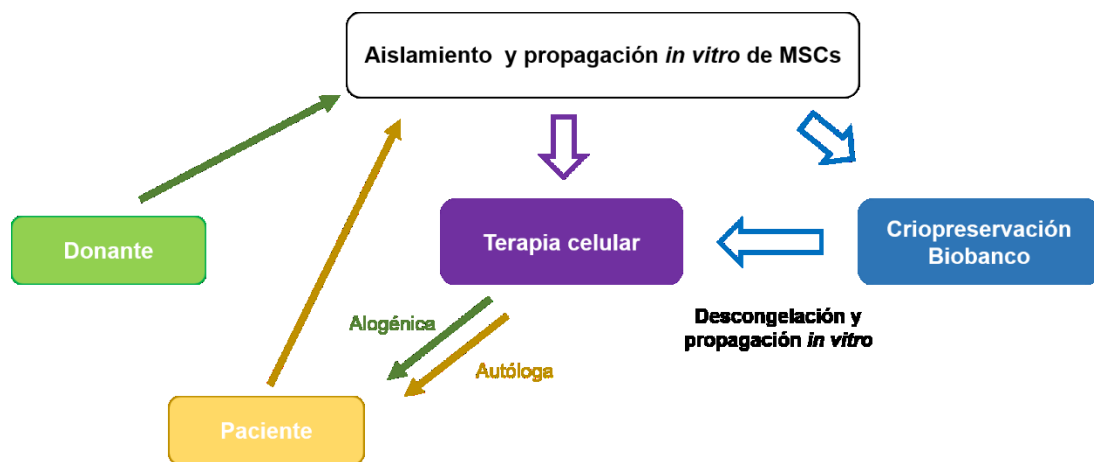


Fig. 2. Esquema de la terapia celular utilizando células madre mesenquimales (MSCs). Las células pueden ser obtenidas de diversos tejidos, con mayor frecuencia de médula ósea o tejido adiposo, tanto del paciente o de un donante de la misma especie. Posteriormente, deben ser propagadas *in vitro* para aumentar su cantidad inicial y poder ser acondicionadas para la terapia celular. Otra opción, es contar con MSCs en un biobanco y al momento de ser requeridas pueden propagarse rápidamente y aplicadas. Los biobancos potencialmente pueden acortar los tiempos de tratamiento para el paciente debido que ya se realizó previamente el aislamiento y propagación inicial, permitiendo almacenar un gran número de células.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 La médula ósea y el tejido adiposo como principales fuentes de MSCs

Inicialmente la fuente más estudiada fue la MO, es decir las BM-MSCs, pero en la actualidad existe gran interés por el estudio del tejido adiposo como fuente MSCs descritas posteriormente en los trabajos de Zuk *et al.* (Zuk et al., 2002, 2001). Las AD-MSCs son extraídas de la fracción vascular estromal (del inglés, *stromal vascular fraction: SVF*) mediante digestión enzimática del TA. Esta fuente tiene ciertas ventajas sobre la MO: se estima que el TA tiene aproximadamente 500 veces más MSCs que la MO (Strioga et al., 2012), elevada capacidad de proliferación (Izadpanah et al., 2006; Kern et al., 2006; Bourin et al., 2013) y perdura su multipotencialidad por un número mayor de pasajes (Kern et al., 2006; Rebelatto et al., 2008). Estas características motivaron la intensificación de los estudios de las AD-MSCs como fuente segura y conveniente para el uso en medicina regenerativa. Es conocido que las poblaciones de MSCs presentan leves diferencias entre si, según de cual fuente son extraídas, ya sea MO o TA, de todas maneras, ambas son utilizadas en medicina regenerativa con éxito. A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, las BM-MSCs son las más estudiadas en ensayos clínicos humanos, con un total de 374 en comparación a los 108 para AD-MSCs (ClnalTrials, 2019). Esto se debe a la mayor experiencia con células derivadas de médula ósea y su inocuidad en la aplicación, sumado a que el TA como fuente de MSCs fue descubierto posteriormente.

Se ha profundizado aún más sobre cada fuente de MSCs y se han descrito diferencias en las células extraídas de la misma fuente, pero de sitios anatómicos distintos. Por ejemplo, se ha descrito que la fuente de TA subcutáneo (Sc) posee MSCs con mayor capacidad proliferativa *in vitro* que la visceral (Vs) en caninos (Neupane et al., 2008; Guercio et al., 2013) y humanos (Baglioni et al., 2012). Estas diferencias han motivado a seguir explorando otras características de interés como la multipotencialidad, en este punto existe gran divergencia entre los autores sobre cuál sitio anatómico provee MSCs con mayor capacidad de diferenciación *in vitro* o cual fuente preserva con mayor longevidad esta característica, este tópico será abordado a continuación.

2.2 Multipotencialidad de las MSCs

Las MSCs presentan multipotencialidad lo que permite bajo determinadas condiciones inducir las a diferenciarse en linajes como el adipogénico, condrogénico, osteogénico y otros pertenecientes al mesodermo como el miogénico (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013), sin embargo, existe el fenómeno de transdiferenciación *in vitro* debido que poseen la capacidad de diferenciarse a linajes celulares derivados del ectodermo como las neuronas (Song et al., 2019) o también del endodermo como los hepatocitos (Sawitza et al., 2015). Para dirigir la diferenciación de una MSCs *in vitro* se utilizan medios inductores para que se transformen en un linaje adulto totalmente comprometido y estos cambios se evidencian a través de su morfología celular, síntesis de matriz y perfil de expresión génica (Bourin et al., 2013). Se ha despertado gran interés por evaluar diferencias en la multipotencia de las MSCs según su fuente y/o pasaje celular. En especial la diferenciación el linaje óseo debido a su potencial uso en medicina ortopédica, específicamente en grandes defectos óseos, y por ello existen diversos estudios que comparan su osteopotencial. Este punto es bastante controversial en la literatura

sobre si alguna de las fuentes tiene un mayor potencial, algunos estudios describen que la BM-MSCs poseen un mayor potencial osteogénico (Sakaguchi et al., 2005; Noël et al., 2008) en contradicción a otros que describen similar potencial entre fuentes (De Ugarte et al., 2003; Pachón-Peña et al., 2011) u otro que asigna mayor potencial a las AD-MSCs (Kang et al., 2012). Por otro lado, también se han explorado las diferencias que presentan AD-MSCs extraídas de diferentes sitios anatómicos, específicamente en el Sc y Vs, para determinar si existe alguna diferencia entre las subpoblaciones. Algunos autores describen que las células provenientes del Sc poseen un mayor poder osteogénico *in vitro* (Baglioni et al., 2012; Requicha et al., 2012), en cambio otros describen a la fuente Vs con mayor potencial (Peptan et al., 2006). Estas contradicciones se pueden ver también para otros linajes como adipogénico y condrogénico (Baglioni et al., 2009, 2012), por lo que, esta heterogeneidad de resultados puede explicarse porque existen diferencias en la especie estudiada, condición de aislamiento y cultivo de las células, la edad y sexo de los donantes, que podría tener un efecto sobre la multipotencialidad de las MSCs y reflejarse en estas divergencias.

Por otro lado, se ha demostrado que los sucesivos pasajes para la propagación *ex vivo* afecta negativamente la multipotencialidad de las MSCs. Para ser utilizadas con fines terapéuticos usualmente se aumenta su cantidad mediante la proliferación *in vitro* y se utilizan en un rango de pasaje 1 y 6, dependiendo de la especie, o incluso pasajes más altos para obtener un gran número de células, pero ya se sabe para algunas especies que en determinado número de pasajes puede existir una caída de la multipotencialidad. Se ha visto un efecto negativo, con el aumento de pasajes existe simultáneamente una drástica caída de biomarcadores o capacidad de síntesis de matriz desde pasaje 3 o 4 en adelante en especies domésticas (Requicha et al., 2012; Lee et al., 2014; Panasophonkul et al., 2017; Lee et al., 2018). Entonces, este es un aspecto crítico debido que aplicar MSCs en altos pasajes puede significar que han perdido sus atractivas características de multipotencialidad y potencialmente podría tener un efecto negativo sobre sus propiedades terapéuticas.

Es importante recordar que cuando son aplicadas las células en patologías que existe un microambiente proinflamatorio, como por ejemplo la osteoartritis o no uniones óseas y ese es el entorno real que enfrentan las células *in vivo*. Por ello, se ha evaluado el efecto de diferentes microambientes proinflamatorios *in vitro* sobre la multipotencialidad de las MSCs. Lacey et al. (2009) describen un efecto negativo sobre la capacidad osteogénica de las MSCs a medios inductores con el adición de citoquinas proinflamatorias, como interleuquina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), observan un detrimento de la síntesis de matriz mineralizada ósea y una menor expresión de factores de transcripción fundamentales como *Runx-related transcription factor 2* (Runx2) y Osterix (Osx), los cuales, están implicados en la diferenciación osteoblástica en etapas tempranas. Este efecto negativo se ha visto en otros trabajos (Ding et al., 2009; Sinha and Zhou, 2013; Barrachina et al., 2017b). Asimismo, otros autores han descrito unas leves diferencias de multipotencialidad entre células en determinadas condiciones proinflamatorias vs sin estímulo (Liotta et al., 2008; Barrachina et al., 2017a), por lo que, estos trabajos sugieren que no existiría un gran impacto en potencialidad para ser aplicadas *in vivo*. Por otro lado, en el trabajo de Lombardo et al. (2009) describe que agonistas de receptores tipo toll 3 (TLR-3) y TLR-4 tienen un efecto beneficioso sobre la capacidad osteogénica de las MSCs y no tienen efecto sobre los linajes adipogénico y condrogénico. Por último, a pesar de existir algunas divergencias en cuanto a si las citoquinas o los agonistas de TLR afectan la multipotencialidad de las MSCs, lo que si se ha evidenciado es que el efecto negativo sobre la multipotencialidad se da en

forma dosis dependiente para las citoquinas proinflamatorias (Lacey et al., 2009; Barrachina et al., 2017a, 2017b) y esto podría explicar las diferencias entre trabajos y por ello debe tenerse en cuenta para su uso *in vivo* ya que el microambiente proinflamatorio del paciente potencialmente podría afectar negativamente la multipotencialidad de las células aplicadas.

2.3 Aspectos inmunológicos de las MSCs

Anteriormente se describió a las MSCs como “inmunoprivilegiadas” debido a que no eran rechazadas en implantes heterólogos (allogénicos o xenogénicos) por parte del huésped, esta característica aumentó aún más el interés para su uso terapéutico debido a que no se necesitaría buscar compatibilidad con el huésped (Uccelli et al., 2007; Puymirat et al., 2009; Ankrum and Karp, 2010). Sumado a la evidencia clínica de que eran beneficiosas para afecciones autoinmunes o inmunomediadas en humanos y animales (Ankrum and Karp, 2010; De Schauwer et al., 2013; Vangsness et al., 2014; Roy et al., 2019;). Sin embargo, este paradigma de inmunoprivilegiadas empezó a perder credibilidad cuando diferentes autores comenzaron a describir reacciones inmunológicas de rechazo a las MSCs allogénicas. El alorreconocimiento de los MHC tipo I y II está implicado en la respuesta inmune celular y humoral contra las MSCs heterólogas incompatibles con el huésped hallando linfocitos alorreactivos de memoria en los pacientes receptores de la terapia (Eliopoulos et al., 2005; Badillo et al., 2007;). Entonces, debido a la evidencia de que pueden ser rechazadas en el caso de origen allogénico, cuando son incompatibles, se ha reemplazado el antiguo concepto de inmunoprivilegiadas por el de “inmuno-evasivas” debido a que son reconocidas por el sistema inmune del huésped, pero a su vez pueden conseguir evadir la respuesta ya que no generan una respuesta de rechazo intensa como ocurre en los trasplantes de tejidos u órganos (Waterman et al., 2010; Ankrum et al., 2014). El reconocimiento y posterior rechazo va a depender en definitiva del equilibrio entre su poder inmunoregulador y su capacidad inmunogénica (Ankrum et al., 2014). Esta situación está dada debido que las MSCs son capaces de liberar compuestos inmunosupresores de los que se destacan el óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), interleuquina 10 (IL-10) entre otros (Waterman et al., 2010; Ankrum et al., 2014). Además, tiene la capacidad de estimular células antiinflamatorias como linfocitos T_{reg} y macrófagos antiinflamatorios (M2) que potencian su poder supresor (François et al., 2012; Anderson et al., 2013). Sumado a que se ha visto que el contacto célula-célula potencia su potencial inmunosupresor demostrado con co-cultivo de MSCs con leucocitos permitiendo el contacto celular poseen un mayor efecto de supresión comparado con los co-cultivos que no se permite el contacto (Beyth, 2005; Gur-Wahnon et al., 2009). Por último, aún no han sido elucidados completamente los mecanismos de inmunomodulación, pero lo que si podemos decir es que las MSCs son inmuno-evasivas y que sus moléculas bioactivas de efecto paracrina y la interacción celular permiten su efecto evasivo e inmunosupresor que tanto interés despierta en la medicina humana y veterinaria.

Desde el punto de vista inmunológico en el 2010 se plantea un nuevo paradigma por varios autores que proponen la existencia de dos perfiles de MSCs, uno de ellos es el proinflamatorio (MSC1) y el otro antiinflamatorio (MSC2) (Bunnell et al., 2010; Waterman et al., 2010) regulado por la señalización celular mediada agonistas de los TLR. Esta clasificación está basada en la similaridad con el perfil que se describe para los macrófagos, ya que cuando un monocito recibe estímulos proinflamatorios por interferón gamma (INF- γ)/TNF- α o estímulos ligados a TLR-4 se polariza a un

clásico perfil M1 que participa de la respuesta inflamatoria como fagocito y célula presentadora de antígenos, por otro lado, existe el perfil M2 observado cuando es estimulado con IL-4 un monocito adquiere capacidad antiinflamatoria y favorece la cicatrización con la secreción de por ejemplo IL-10 (Martinez et al., 2006; Verreck et al., 2006). Con estos antecedentes el grupo de Waterman et al. (2010) tomaron como referencia para definir dos perfiles de MSCs dependientes de la señalización vía TLR o por citoquinas proinflamatorias y con diferentes funciones biológicas. Ya se ha descrito que las MSCs tienen TLR que le permiten reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de los que se destacan dos vías de señalización, una de ellas es la del TLR-3 que detecta la presencia de CpG-ADN metilado de virus y bacterias, y sería capaz de inducir un perfil MSC2 (inmunosupresor), y la otra es la del TLR-4 que reconoce lipopolisacáridos pertenecientes a la pared bacteriana y sería capaz de inducir un perfil MSC1 (proinflamatorio). Entonces, este grupo sugiere que las MSC2 tendrían un efecto inmunosupresor mayor que las MSC1 inducidas por agonistas por TLR-4.

Continuando con este tópico, las evidencias científicas muestran que el paradigma planteado de MSC1 y MSC2 similar al de los monocitos no está del todo elucidado, ni tampoco concuerdan esos perfiles definidos, con los resultados observados por otros autores. Actualmente, diversos trabajos observan que ante condiciones proinflamatorias las MSCs son capaces de aumentar su inmunogenicidad pero paradójicamente también su potencial inmunomodulador y de esta manera consiguen evadir al sistema inmune (Ankrum et al., 2014; Barrachina et al., 2018, 2017a; Cassano et al., 2018a). Algunos estudios sugieren que es potenciada la capacidad inmunomoduladora de las MSCs cuando reciben un estímulo con INF- γ /TNF- α (Barrachina et al., 2017a; Szabó et al., 2015). En el trabajo de Cassano et al. (2018b) se observa que tanto las MSCs estimuladas con agonistas de TLR-3 y TLR-4 presentaban una capacidad superior de inmunosupresión de linfocito *in vitro* en comparación a células sin estímulo previo. Además, observaron que la población de MSCs estimuladas, tanto por vía TLR-3 o TLR-4, y con la presencia de MHC II poseían un poder inmunosupresor mayor que aquellas poblaciones estimuladas, pero sin expresión de MHC II. Entonces, en base a las evidencias actualmente descritas sobre la posibilidad de aumentar sus propiedades inmunosupresoras *in vitro* se ha propuesto por varios autores que podrían pre-estimular con agonistas de TLR-3 o TLR-4 a las MSCs previo a su aplicación terapéutica y así dar una terapia con mayores beneficios desde el punto de vista inmunomodulador. Recientemente, se ha descrito la aplicación de MSCs pre-estimuladas sobre osteoartritis inducida en equinos y demostraron que estas células pre-estimuladas tuvieron un efecto beneficioso (Barrachina et al., 2018). Por último, se debe profundizar sobre los perfiles de MSCs adquiridos según su microambiente, ya que permitirá elucidar los mecanismos de modulación utilizados para suprimir al sistema inmune *in vivo* y conocer cómo potenciar su potencial para su uso en patologías inmunomediadas.

2.4 Suero fetal bovino “gold standard supplement”

El cultivo de células provenientes de mamíferos tuvo un gran desarrollo por la década de 50 cuando Harry Eagle describe el medio basal (*Eagle's minimal essential médium*; MEM) el cual está compuesto por una mezcla de 29 compuestos, entre ellos tenemos aminoácidos, vitaminas D-glucosas y sales inorgánicas. Para el cultivo de células se necesitaba suplementar con suero humano o equino para promover el crecimiento (Eagle, 1955). Hoy en día, el suplemento más utilizado para estimular el crecimiento de células eucariotas es el suero fetal bovino conocido

internacionalmente como *fetal bovine serum* (FBS) el cual brinda los estímulos y nutrientes necesarios para la supervivencia y proliferación de las células, definido por la literatura como “*the gold standard supplement*” (Hemeda et al., 2014). Existe una demanda creciente del FBS debido al desarrollo de la biotecnología, aplicado a terapias celulares, fertilización *in vitro*, banco de células y productos recombinantes (Jochems et al., 2002; van der Valk and Gstraunthaler, 2017).

Sin embargo, a pesar del gran aporte del FBS para el desarrollo de la biotecnología existen algunos aspectos negativos desde el punto de vista ético y científicos que han motivado la búsqueda de alternativas por parte de la comunidad científica. Existen varios motivos por el cual se ha convertido en el suplemento universal entre ellos se destaca: a) fácil extracción y producción; b) es eficaz en diversos linajes celulares de humanos y animales; c) alta concentración de factores de crecimiento y hormonas fetales que estimulan la proliferación celular. Por otro lado, existen desventajas como: a) aún no se han identificado la totalidad de los componentes; b) variabilidad entre lotes; c) alta presencia de endotoxinas; d) alta presencia de proteínas xenogénicas incorporada al cultivo celular. A continuación, ampliaremos las desventajas más destacadas por varios autores y que conllevan a un gran problema para el desarrollo de la terapia celular con MSCs (Hemeda et al., 2014).

En primer lugar, se abordará el aspecto ético, el cual es paradójico, porque el desarrollo de cultivos celulares *in vitro* con el suplemento de SFB, ha tenido un gran impacto en el desarrollo de ciencia e industria biotecnológica. Además de contribuir con el bienestar animal, ya que se han podido reemplazar modelos animales por experimentos *in vitro* cumpliendo con el principio de reemplazo, reducción y refinaiento conocido internacionalmente como 3Rs (Russell and Burch, 1959). Sin embargo, en la actualidad se ha comenzado a evaluar el impacto negativo que tiene el uso de FBS debido a que su extracción se realiza en fetos vivos. Por lo que, en un principio este producto idealmente contribuye al reemplazo de animales experimentales en la actualidad se esta convirtiendo en un problema ético por su extracción. Para obtener el FBS se debe realizar una punción intracardiaca hasta desangrar al feto de al menos 3 meses de desarrollo, en esta etapa el feto tiene un sistema nervioso que le permite experimentar dolor y discomfort antes de morir (Hodgson, 1995; Jochems et al., 2002). Una vez extraída la sangre por un proceso de centrifugación, se separa el suero del resto de elementos formes de la sangre como células sanguíneas y la red de fibrina resultante de la coagulación. Una vez filtrado se procesa y acondiciona para su distribuido a nivel comercial (Jochems et al., 2002; van der Valk and Gstraunthaler, 2017).

En segundo lugar, desde el punto de vista científico aparecen varios inconvenientes de los que se destacan la variación entre lotes, xenocontaminación y transmisión de microbios o priones. También se ha visto que existen variaciones con el crecimiento de las células con lotes diferentes de FBS, este representa un problema que afecta la reproducibilidad de los experimentos, este fenómeno puede darse por la variabilidad individual de cada feto y que son extraídos en diferentes etapas de desarrollo del mismo (Baker, 2016; van der Valk and Gstraunthaler, 2017). El uso de FBS supone un gran problema por la posible transmisión de microbios y priones. En el trabajo de Toohey-Kurth et al. (2017) evaluaron 20 lotes de diferentes empresas y únicamente uno de los lotes evaluados estaba libre de virus, además vieron que la contaminación viral más común era la diarrea viral bovina (BDVD), así pues, otro de los contaminantes importantes fue del género *Mycoplasma* ya que no se puede eliminar por filtración debido a su tamaño y resistencia a los antibióticos utilizados en el medio de cultivo (Olarerin-George and Hogenesch, 2015; Baker, 2016). Asimismo, la contaminación por priones presenta un potencial riesgo debido que podría

vehiculizar la proteína priónica patológicas (PrPSc) en productos biotecnológicos como las vacunas, por lo que, ya existen trabajos que buscan métodos para remover estas proteínas peligrosas de los medios de cultivos celulares (Chou et al., 2015). Por otro lado, la contaminación de las células con xenoproteínas representa un problema para el desarrollo de la terapia celular con MSCs debido a que en diversos trabajos se demuestra la internalización de proteínas del FBS en las células y la promoción de una respuesta inmune a esas proteínas (Spees et al., 2004; Joswig et al., 2017). Asimismo, se suma el problema económico debido a los altos costos de los FBS producidos en condiciones GMP (del inglés, *good manufacturing practices*). En suma, estas desventajas éticas, científicas y económicas hace más de una década llevaron a la comunidad científica a desarrollar nuevas estrategias para elaborar novedosos suplementos que no arrastren los viejos problemas del FBS.

2.5 Desarrollo de medio libre de componentes xenogénicos

A raíz de los inconvenientes éticos y científicos descritos anteriormente la industria ha buscado diferentes métodos para mitigarlos, pero en el caso de cultivo de MSCs, los científicos apuntan a los medios denominados “*serum-free media*” ya que no se desea usar el clásico suplemento para la propagación *in vitro* de estas células. Entonces, se han desarrollado diferentes tipos de medio de cultivo los cuales dependiendo de su composición se clasifican en diferentes categorías según la ISCT (Hemeda et al., 2014), ver definiciones en Cuadro I.

Cuadro I: Criterios para la definición de diferentes medios de cultivo.

Tipos de medio de cultivo	Definición
Medio libre de componentes xenogénicos	Todos los componentes son sintéticos o derivados de la especie de origen de las células cultivadas. La adición de componentes recombinantes es considerado aceptable para esta definición de cultivos. Conocido internacionalmente como <i>xeno-free media</i> .
Medio libre de suero	No comprende ningún suero ni animal, ni humano. Se pueden incluir proteínas y factores recombinantes e incluso componentes animales no derivados del suero. Conocido internacionalmente como <i>serum-free media</i> .
Medio libre de componentes de animales	Están desprovistos de cualquier componente animal. Se admiten proteínas recombinantes y que la placa de cultivo puede estar recubierta con proteínas séricas. En esta categoría hay algunos malos entendidos cuando se utilizan componentes humanos, ya que también están comprendidos dentro del reino animal. Conocido internacionalmente como <i>free-animal media</i> .
Cultivo totalmente libre de componentes animales	Ídem a la definición de <i>free-animal media</i> pero en este caso no admite placas con recubrimiento de proteínas de origen animal. Conocida internacionalmente como <i>animal-free culture conditions</i> .
Cultivo totalmente sintético libre de factores de crecimiento	Comprenden únicamente proteínas sintéticas con actividad conocida. Este tipo de medio puede ser completamente estandarizado. Conocido internacionalmente como <i>Fully defined synthetic culture media without growth factors</i> .

Cuadro adaptado de Hemeda et al. (2014)

En la presente tesis abordaremos en detalle los *xeno-free media*, del cual se destaca el estudio del lisado plaquetario (*platelet lysate*; PL) alogénico en varias especies

para el cultivo de MSCs como alternativa al FBS (Hemeda et al., 2014; Russell et al., 2015; Astori et al., 2016; Naskou et al., 2018). Es importante remarcar que puede existir la confusión o mal uso de definiciones cuando es denominado en la literatura *serum-free media* aquellos medios suplementados con PL debido que el plasma presenta compuestos compartidos con el suero y por ello no debería categorizarse así.

Hace aproximadamente 20 años se comenzó a buscar una alternativa al FBS con *xeno-free media*. Comienzan con los trabajos que probaron el suero humano como alternativa, el cual, se comportó aceptablemente en cuanto a mantener indiferenciadas a las células e inmunofenotípicamente similares a las cultivadas en condiciones estándar para MSCs humanas. No obstante, existía un decaimiento en la tasa de proliferación (Koller et al., 1998; Stute et al., 2004), por ello en algunos trabajos se les adicionan factores de crecimiento recombinantes para promover el crecimiento (Yamaguchi et al., 2002; Spees et al., 2004). Poco después, se comenzó a buscar derivados plasmáticos ricos en factores de crecimientos, uno de ellos es el PRP ampliamente utilizado con fines terapéuticos en patologías ortopédicas (Cengiz et al., 2018). Se sabe que al concentrar las plaquetas se obtiene una sustancia rica en factores de crecimiento y se comprobó que era capaz de promover la proliferación de las MSCs (Vogel et al., 2006; Atashi et al., 2015). A continuación, debido a los inconvenientes técnicos que presentaba el PRP se reemplazó por el uso del PL, debido a que minimizan los restos celulares de las plaquetas en el cultivo y previa a su uso se somete a uno o varios ciclos de descongelado para promover la liberación de los factores de crecimiento de manera soluble. Asimismo, su composición aún no está del todo determinado, pero se conoce cuáles son los factores de crecimiento de relevancia para estimular el crecimiento celular como: factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*insulin-like growth factor 1*, IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), factor plaquetario 4 (*platelet factor 4*, PF4) entre otros (Hemeda et al., 2014; Iudicone et al., 2014; Astori et al., 2016).

Para finalizar, en las últimas décadas la comunidad científica empezó a plantear como un candidato factible a reemplazar el FBS, el uso de PL autólogo o alogénico en el cultivo de MSCs en humanos y especies domésticas. El uso de PL como suplemento de cultivo de las MSCs para humanos comienza en 2005 (Doucet et al., 2005) y 2 años más tarde se describe para equinos (Del Bue et al., 2007). A continuación, tan solo 4 años posteriores a su descripción se realiza un ensayo clínico en el cual las MSCs fueron expandidas con el nuevo suplemento (von Bonin et al., 2009), y posteriormente se sumaron diversos trabajos que evalúan al PL como el futuro reemplazo de FBS (Hemeda et al., 2014; Iudicone et al., 2014; Astori et al., 2016). Este fenómeno se debe a las ventajas que presenta el PL con respecto a FBS (ver Cuadro II). Tal es así, que se plantean soluciones para diferentes dificultades que implicaría su producción industrial como: la producción a gran escala de PL libre de patógenos (Iudicone et al., 2014), cuál es la concentración adecuada para la propagación *ex vivo* de MSCs (Russell and Koch, 2016; Naskou et al., 2018) y que variabilidad individual presenta el PL (Lohmann et al., 2012). Por último, en el caso de animales domésticos existen recientes antecedentes bibliográficos que evalúan PL como suplemento de cultivo de las MSCs para caninos (Russell et al., 2015) y equinos (Naskou et al., 2018; Russell and Koch, 2016) que muestran resultados alentadores para su uso, de todas maneras existe escasa e incipiente información de cómo afecta este reemplazo de suplemento a la cinética de crecimiento *in vitro*,

multipotencialidad y perfil inmunológico de las MSCs de especies domésticas, los cuales, son aspectos biológicos de relevancia terapéutica y parece necesario profundizar sobre ello.

Cuadro II. Resumen de ventajas y desventajas del suero fetal bovino (FBS) vs lisado plaquetario (PL) para el cultivo de células madre mesenquimales (MSCs).

FBS	PL
<i>Ventajas</i> • Aplicable a una amplia variedad de linajes celulares incluyendo las MSCs. • Alta concentración de factores de crecimiento. • Es posible producirlo a gran escala y está estandarizado su procesamiento. • Se conoce su comportamiento en ensayos pre-clínicos y clínicos sin causar graves reacciones adversas. <i>Desventajas</i> • Todavía no se conoce todos sus componentes. • Alta variabilidad lote a lote. • Puede contener y vehicular en productos biotecnológicos: xenoproteínas, microbios y priones. • Su método de extracción tiene cuestionamientos éticos. • Alto costo.	<i>Ventajas</i> • Aplicable para el cultivo de MSCs y otros tipos celulares. • Enriquecido con factores de crecimiento derivados de las plaquetas. • Gran estimulador de la propagación <i>ex vivo</i> de las MSCs • El uso en ensayos pre-clínicos y clínicos no ha reportado reacciones adversas significativas. • No tiene los problemas de xenocontaminación del FBS. • El uso autólogo minimiza los riesgos de respuesta inmune o de transmisión de patógenos. <i>Desventaja</i> • Riesgo en el uso alogénico de transmitir patógenos al receptor. • Existe variación individual entre PL cuando es usado para propagación <i>ex vivo</i>. • Potencial alorrespuesta en el receptor. • Producción a gran escala aún se está desarrollando. • En animales domésticos de gran porte es factible su producción a gran escala, pero en pequeños animales no es tan factible. • El uso autólogo en algunos casos es poco factible por el volumen que se puede extraer o el estado de salud paciente.

Cuadro adaptado de Hemeda et al. (2014)

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La falta de tratamientos eficaces para diferentes patologías tanto en animales como en la especie humana ha aumentado el interés por las terapias basadas en MSCs en los últimos años. Los resultados obtenidos hasta el momento son prometedores, pero en algunos casos resultan contradictorios quedando todavía muchas preguntas sin respuesta que permitan la consecución de terapias seguras y eficaces. Ha habido en los últimos años cambios de paradigma importantes en cuanto a las MSCs, su mecanismo principal de acción se asocia a su potencial inmunomodulador y no tanto a su capacidad de diferenciación e integración en el tejido lesionado, así como que ya no se consideran inmunoprivilegiadas y por tanto pueden ser reconocidas por el sistema inmune del receptor cuando hay incompatibilidad donante-receptor. Algunos de las interrogantes que busca responder la comunidad científica y también en esta tesis son las siguientes: ¿Qué fuente de MSCs y qué pase celular son óptimos para utilizar con fines terapéuticos? ¿Podemos mejorar las condiciones de las MSCs *in vitro*? ¿Podemos sustituir el uso de proteínas xenogénicas como suplemento?, ¿Conocemos en profundidad sus diferencias interespecies?, Cuando existe falta de eficacia observada en algunos tratamientos ¿es originada por las propias células o por las condiciones en las que se aplican? ¿Qué dosis, vía, frecuencia? y ¿En qué etapa del proceso patológico realizar la aplicación?

Las respuestas a todas estas preguntas pueden contribuir al conocimiento en profundidad de las características de las MSCs en animales domésticos, además, al desarrollo de la medicina regenerativa que permita encontrar la solución a patologías para las que los tratamientos convencionales no son eficaces.

Para cada especie se han priorizado las siguientes estrategias de estudio: en la especie canina, se planteó profundizar en cómo el sitio de extracción influye sobre las características de las MSCs, debido a la accesibilidad del tejido Sc y Vs durante las ovariectomías de rutina. Si bien en la presente tesis no fue abordado el perfil inmunológico ni el cambio de suplemento por lisado plaquetario alogénico, estos estudios se encuentran en desarrollo en nuestro laboratorio para una etapa futura. En equinos, se planteó profundizar sobre las características de las MSCs, su perfil inmunológico, cinética de proliferación y multipotencialidad *in vitro* cuando se utiliza como suplemento de cultivo el lisado plaquetario alogénico. No se planteó originalmente comparar sitios de extracción de tejido adiposo debido a la dificultad de accesibilidad a muestras de tejido Vs. En felinos, se planteó una primera aproximación a la caracterización de las MSCs debido a los escasos antecedentes a nivel nacional e internacional sobre esta especie en comparación a las otras anteriormente mencionadas.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

El conocimiento de las características de las MSCs y la influencia de factores como el sitio de extracción o el tipo de suplemento de cultivo, contribuirán a desarrollar condiciones óptimas para su propagación *ex vivo* y al progreso de las terapias celulares eficaces y seguras en especies domésticas.

4.2 Objetivos

En la presente Tesis doctoral se han planteado un Objetivo general y unos Objetivos específicos para las diferentes especies.

4.2.1 Objetivo general

Profundizar en diferentes características de las MSCs en tres especies de animales domésticos: caninos, equinos y felinos.

4.2.2 Objetivos específicos

A continuación, se especifican los objetivos para cada especie:

CANINA

- a) Aislar y caracterizar las MSCs según criterios internacionales.
- b) Comparar las características inmunofenotípicas y de multipotencialidad *in vitro* de las MSCs provenientes de sitios anatómicos diferentes.
- c) Evaluar el efecto sitio y pasaje celular sobre el potencial osteogénico *in vitro* de las MSCs.

EQUINA

- a) Aislar y caracterizar las MSCs según criterios internacionales.
- b) Evaluar el uso del PL alogénico como suplemento de cultivo sobre la capacidad proliferativa, multipotencialidad y el perfil inmunogénico e inmunomodulador de las MSCs.

FELINA

- a) Aislar y caracterizar a las MSCs según criterios internacionales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para facilitar la comprensión de los *MATERIALES Y MÉTODOS* y no redundar en los mismos en la presente tesis se describe brevemente el conjunto de experimentos realizados. Se puede encontrar la descripción detallada en cada manuscrito incluido en *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*.

5.1 Animales

Manuscrito I: se utilizaron como donantes 5 caninos (*Canis familiaris*) y 6 felinos (*Felis catus*), el tejido adiposo (TA) fue obtenido de hembras saludables, destinadas a ovariectomía de rutina, raza mestiza, edad de 1 a 5 años. Se tomaron muestras de TA a nivel Sc y Vs (zona periovárica y/o intrabdominal). El protocolo de extracción contó con la previa autorización de la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA), CEUAFVET PI N° 13/12 y CEUA n° 144. Además, fueron tomadas muestras *post-mortem* de 4 equinos (*Equus caballus*) adultos saludables con destino a frigorífico. Cuando se obtenía la media res, resultante del proceso de faena, se tomó el TA de la zona posterior en la base de cola.

Manuscrito II: las muestras de TA fueron tomadas de 5 caninos (*Canis familiaris*) hembras saludables entre 5 a 11 meses de edad, en interestro. La extracción de TA fue de dos fuentes: Sc de la región del flanco y Vs de la región periovárica durante el proceso de rutina de ovariectomía. La extracción fue autorizada por la *Comissão de ética no uso de animais do Hospital de Clínicas de porto Alegre* (CEUA/HCPA) número 130510, Brasil.

Manuscrito III: se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena yugular de 3 equinos (*Equus caballus*) adultos mestizos saludables a través de venopunción. Los procedimientos de extracción contaron con la autorización de CEUA-FVET número 300. Además, para la obtención de TA se utilizaron 4 equinos adultos saludables con destino a frigorífico. Cuando se obtenía la media res (*post-mortem*) se tomó una muestra de la zona posterior en la base de cola.

Manuscrito IV: se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena yugular de 3 equinos (*Equus caballus*) adultos saludables a través de venopunción. Los procedimientos fueron autorizados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, licencia de proyecto PI 31/11. Las BM-MSCs utilizadas provenían del criobanco de células madre del LAGENBIO, Universidad de Zaragoza, España, las cuales fueron extraídas a 3 equinos saludables y contaban con el consentimiento de los propietarios para que sean utilizadas con fines terapéuticos y/o científicos. El uso y cuidado de todos los animales se realizó de acuerdo a la legislación española sobre Protección Animal RD53/2013, en cumplimiento con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 para la protección de animales utilizados en experimentación y con otros fines científicos.

5.2 Aislamiento y propagación *ex vivo* de las MSCs

5.2.1 Extracción de tejido adiposo

Cuando a los caninos y felinos se los sometía a la cirugía de rutina para su esterilización, la cual es la ovariectomía, durante ese procedimiento a cargo de un profesional veterinario se aprovechó dicho acto para extraer una muestra de TA a

nivel Sc. Se retiraron 0,5–4 gr de TA de origen Sc una vez que se realizó la incisión inicial en piel, posteriormente, se colectó de origen Vs una vez que se ingresó a la cavidad abdominal (zona periovárica y/o intrabdominal). El TA fue depositado en tubos estériles con el medio de transporte (MT): *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) bajo en glucosa, 10% FBS y 2% antibiótico (ATB) compuesto por penicilina/estreptomicina y procesado en un tiempo máximo de 24 h. Por otro lado, para equinos la extracción se realizaba sobre la media res (*post-mortem*), resultante del proceso de faena, se tomó la muestra de la zona posterior en la base de cola. El procedimiento se realizó con pinza y tijera quirúrgica estéril, tomando entre 5–10 gr y transportado bajo refrigeración (4–8 °C) en tubo estéril con MT.

5.2.2 Extracción de médula ósea

Se extrajeron 20–40 mL de médula ósea del esternón con una jeringa heparinizada utilizando una aguja Jamshidi 11G para caballos y el procedimiento se realizó bajo sedación, este protocolo está adaptado a lo descrito en la literatura (Barrachina et al., 2016). Las muestras fueron refrigeradas hasta su procesamiento.

5.2.3 Aislamiento de MSCs

AD-MSCs: el TA se cortó en trozos y dispensó en un tubo con solución tampón fosfato salino (PBS) y fue lavado dos veces. EL TA fue sometido a una digestión enzimática durante 40 minutos a 37°C en una solución de DMEM bajo en glucosa con 0,1 mg/mL de collagenasa tipo I. Posteriormente fue centrifugado a 700g durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido y sembrado en botellas de cultivo o placas. El medio de crecimiento estándar (MC) utilizado fue compuesto por DMEM, entre 10–20% FBS y 2% ATB (penicilina/estreptomicina). Procedimiento realizado y detallado en los Manuscritos I, II y III.

BM-MSCs: Se extrajo la capa flogística de las muestras de MO heparinizadas a través de gradiente de densidad por centrifugación a 800g por 20 min utilizando *Lymphoprep* (Atom), procedimiento realizado para la obtención de MSCs en el Manuscrito IV. Posteriormente fueron sembradas con MC. Por último, ambas fuentes de MSCs (AD-MSCs y BM-MSCs) fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Diariamente se evaluaba morfología y crecimiento celular, entre 48–72 h se cambiaba el medio de crecimiento. Cuando llegaban al 80–90% de confluencia se realizaba el pasaje del cultivo celular.

5.3 Proliferación celular

5.3.1 Tiempo de duplicación celular

La cinética de crecimiento fue determinada a través del ensayo del tiempo de duplicación celular, conocido como *cell doubling times* (DT) determinado con las dos siguientes fórmulas: 1) $CD = \ln(N_f/N_i)/\ln(2)$ y 2) $DT = CT/CD$, donde CD = número de células duplicadas; N_f = número final de células; N_i = número inicial de células; CT = tiempo de crecimiento celular. Fórmula previamente descrita para evaluar crecimiento celular de las MSCs (Vidal et al., 2007). Procedimiento realizado y detallado en los Manuscritos III y IV.

5.3.2 Ensayo de MTT

Se utilizó la prueba de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) para valorar la proliferación celular mediante la determinación de viabilidad celular de esta prueba, se realizó con un protocolo previamente descrito (Ranera et al., 2012). Fueron sembradas 1600 células/hoyo en una placa de 96 hoyos durante 7 días para las tres diferentes condiciones (FBS, BPL y CPL). Para determinar el número de células viables se utilizó una curva estándar (0–60.000 células/hoyo) y la viabilidad celular se pudo determinar a través de un espectrofotómetro (570 nm). Procedimiento realizado y detallado en el Manuscrito IV.

5.4 Caracterización de las MSCs

5.4.1 Inmunofenotipo

Citometría de flujo

Fue determinado el perfil inmunofenotípico en las MSCs caninas extraídas de las fuentes Sc y Vs en diferentes pasajes celulares a través de la citometría de flujo. Las células fueron lavadas con la solución *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) compuesta por solución tampón salina sin los cationes Ca^{++} o Mg^{++} , 0,5 Mm EDTA y 0,5% FBS, levantadas con el método de espátula y resuspendidas en FACS. Fueron centrifugadas a 400g por 5 min, resuspendidas en FACS y se adicionaron 10 μL de los siguientes anticuerpos: anti-CD44 conjugado con aloficocianina, anti-CD45 conjugado con isotiocianato de fluoresceína y 20 μL de anti-CD90 conjugado con ficoeritrina. Posteriormente fueron incubadas por 30 minutos a 4°C y lavadas con FACS antes de ser analizadas. Para la adquisición de datos se utilizó el FACS Canto II (BD Bioscience) y como mínimo tomando 5000 eventos por muestra. Posteriormente los datos fueron analizados con el software FlowJo. Procedimiento realizado y detallado en el Manuscrito II.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

A través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó la evaluación del perfil de expresión génica de las MSCs equinas para diferentes condiciones (FBS, BPL y CPL) para los genes que codifican los siguientes marcadores de superficie de células mesenquimales: CD44, CD73, CD90, CD105, y de células hematopoyéticas: CD34 y CD4. Los niveles de expresión fueron determinados por el método comparativo de $\Delta\Delta\text{Ct}$. El factor normalizador (NF) calculado con la media geométrica de los dos genes constitutivos y la expresión génica de la condición control FBS. Este cálculo fue utilizado como referencia para determinar *fold-changes*. El protocolo para la evaluación fue adaptado a lo descrito previamente (Barrachina et al., 2016). La descripción del número de acceso para el ARN mensajero y de los genes constitutivos utilizados se encuentran detallados en el Manuscrito IV.

5.4.2 Unidades formadoras de colonias fibroblastoides

La evaluación de la capacidad clonogénica de las MSCs se evaluó a través del ensayo de CFU-F adaptado de lo descrito previamente (Guercio et al., 2013). Se sembraron 1×10^3 células/hoyo en placa de cultivo celular de 6 hoyos. Se utilizó el MC estándar o suplementado con PL (únicamente para equinos) y cada 3 o 4 días se realizaba el cambio el correspondiente cambio de medio. Transcurridas las 2

semanas los cultivos fueron fijados con metanol frío (–20°C) y teñidos con Giemsa. Procedimiento realizado y detallado en los Manuscritos I y III.

5.4.3 Tridiferenciación *in vitro*

Las MSCs fueron inducidas a la diferenciación *in vitro* a los linajes adiposo, cartilaginosos y óseo. Para ello las células fueron sembradas a $9,4 \times 10^3$ células/hoyo en placas de cultivo celular de 24 hoyos. Luego de las 24–48 h de su siembra se reemplaza el MC por medios inductores adaptados a lo descrito en la literatura. Durante 3 semanas las células fueron mantenidas con el medio inductor para cada linaje, realizando periódicamente cambio de medio cada 3–4 días. Por último, una vez terminado el periodo de inducción las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído y teñidas con Oil Red O, Alcian Blue o Alizarin Red S, dependiendo si eran inducida al linaje adiposo, cartilaginosos y óseo. Los medios inductores de diferenciación *in vitro* fueron adaptados de lo descrito para caninos (Vieira et al., 2010), para equinos (Alipour et al., 2015) y para felinos (Quimby et al., 2013). Procedimiento realizado y detallado en los Manuscritos I, II y III.

5.5 Cuantificación de matriz ósea *in vitro*

Se realizó sobre MSCs caninas de la fuente Sc y Vs en diferentes pasajes celulares. Una vez inducido el cultivo se realizó la clásica tinción con Alizarin Red S en condiciones estándar (ver punto 5.4.3) y posteriormente fueron tomadas 9 imágenes microscópicas de manera aleatoria. Para el análisis de matriz ósea se utilizó el software ImageJ, el cual, designaba una cantidad de píxeles correlacionado a la intensidad de la coloración rojiza de la matriz mineralizada. Procedimiento realizado y detallado en el Manuscrito II.

5.6 Perfil inmunogénico e inmunomodulador

Se realizó la evaluación a del perfil inmunológico de las MSCs equinas en diferentes condiciones de cultivo (FBS, BPL y CPL). El perfil de la expresión de genes que codifican moléculas involucradas en la inmunogenicidad y capacidad inmunomoduladora fue evaluado a través de la RT-qPCR. Se evaluaron genes vinculados a la inmunogenicidad como: complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y CD40; genes vinculados a las moléculas inmunomoduladoras: ciclooxygenasa 2 (COX-2), interleuquina 6 (IL-6), molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y indolamina 2, 3-dioxigenasa (IDO). Los niveles de expresión fueron determinados por el método comparativo de $\Delta\Delta Ct$. El factor normalizador (NF) calculado con la media geométrica de los dos genes constitutivos utilizados y la expresión génica de la condición control FBS. Este cálculo fue utilizado como referencia para determinar *fold-changes*. El protocolo para la evaluación fue adaptado a lo descrito previamente (Barrachina et al., 2016). La descripción del número de acceso para el ARN mensajero y de los genes constitutivos utilizados se encuentran detallados en el Manuscrito IV.

5.7 Viabilidad celular post-criopreservación

Las MSCs fueron criopreservadas con diferentes medios de criopreservación los cuales estaban compuestos por 90% FBS o PL alogénico y 10% de DMSO y conservado a –80°C. Fue evaluada la viabilidad celular en tres diferentes momentos:

15, 30 y 60 días, a través de azul de tripano. Procedimiento realizado y detallado en el Manuscrito IV.

5.8 Análisis estadístico

Manuscrito I: las variables fueron analizadas de manera descriptiva. Para las variables CFU-F y para la diferenciación adiposa, condrogénica y ósea fueron evaluadas de forma categórica con dos categorías (SI/NO).

Manuscrito II: se realizó utilizando el software estadístico IBM SPSS (ver. 23.0; IBM, EE. UU.). A través de la ecuación de estimación generalizada (GEE) se evaluó los potenciales de adipogénico, condrogénico y en el caso de linaje osteogénico tanto la diferenciación y como también la capacidad de síntesis de matriz mineralizada. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$, y los valores entre $p > 0,05$ y $p < 0,10$ fueron considerados como indicativos de una tendencia.

Manuscrito III: las variables fueron analizadas de manera descriptiva. Para las variables CFU-F y para la diferenciación adiposo, condrogénica y ósea fueron evaluadas de forma categórica con dos categorías (SI/NO). Además, se realizó la prueba de t-Student para evaluar el comportamiento del DT discriminando el pasaje (P_2 – P_6) y la condición de cultivo (FBS y BPL). La significancia estadística se fijó en $p < 0,05$.

Manuscrito IV: se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism Inc.). Los datos de proliferación del ensayo MTT se analizaron mediante la prueba ANOVA Kruskal-Wallis no paramétrica con la prueba *post-hoc* de Dunn para evaluar las diferencias entre las condiciones (FBS, CPL, BPL) en cada punto de tiempo a lo largo del tiempo (día 1 a 7), además de estudiar las diferencias dentro de cada condición. La prueba pareada de Friedman seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn se usó para comparar los DT de cada condición a lo largo de los pasajes y entre las condiciones en cada pasaje, así como para estudiar las diferencias en la viabilidad post-descongelación a lo largo de los diferentes tiempos de evaluación. Los datos de viabilidad post-descongelación de las condiciones de FBS y CPL se compararon con la prueba pareada de Wilcoxon a lo largo de los diferentes tiempos de evaluación. La expresión de cada gen se comparó entre diferentes condiciones (FBS, CPL y BPL) mediante la prueba de Friedman pareado seguido de la prueba *post-hoc* de Dunn. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. La significación se estableció en $p < 0,05$ para todos los análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 *Presentación de los trabajos y justificación de la unidad temática*

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral en Salud Animal se han conseguido tres publicaciones científicas en revistas arbitradas de impacto internacional y/o nacional en las ciencias veterinarias (Manuscrito I, II y IV). Asimismo, el Manuscrito III se encuentra en una etapa avanzada de preparación y próximamente será enviado a una revista para su evaluación.

En concordancia con los objetivos planteados inicialmente, se caracterizaron las MSCs de las tres especies estudiadas con la evaluación de diferentes propiedades como: morfológica, capacidad clonogénica, proliferación, inmunofenotípica y capacidad tridiferenciación *in vitro*. A continuación, pasaremos a una descripción detallada por especie.

Para las tres especies se planteó caracterizar las MSCs según las recomendaciones internacionales. En el Manuscrito I se puede observar como resultado que fue posible el aislamiento y caracterización de las MSCs provenientes de tejido adiposo de caninos, equinos y felinos.

En caninos, se planteó estudiar como puede influir el sitio anatómico de extracción, el tejido adiposo Sc o Vs, sobre el inmunofenotipo y multipotencialidad *in vitro* de las MSCs. Como resultado se pudo apreciar que conservaban similar inmunofenotipo las células de ambos orígenes. Sin embargo, las células provenientes del tejido Sc presentaron una mayor capacidad de síntesis de matriz ósea que las de origen Vs. Asimismo, en los sucesivos pasajes celulares se observó una disminución en la multipotencialidad *in vitro* para los tres linajes mesodérmicos evaluados. Por último, estos resultados se encuentran en el Manuscrito II, el cual surge por la continuidad de los trabajos realizados en mi tesis de maestría (Yaneselli, 2015).

En equinos, se planteó evaluar el reemplazo del FBS por PL alogénico como suplemento del medio de cultivo. Las células cultivadas con el suplemento PL basal (BPL) presentaron características similares de cinética de crecimiento (Manuscrito III y IV) y multipotencialidad *in vitro* (Manuscrito III). Asimismo, en la condición de PL concentrado (CPL) se observó una mayor cinética de crecimiento que BPL y FBS, cuando fue evaluado el perfil inmunogénico e inmunomodulador, se observó un aumento en la expresión génica en comparación a las condiciones BPL y FBS (Manuscrito IV). Por último, el Manuscrito III surge por la continuidad de los trabajos realizados en la tesis de grado de Fernández y Ríos (2016).

En cada Manuscrito se describe en detalle los objetivos planteados, resultados, discusión y las conclusiones para cada experimento realizado. En todos los trabajos incluidos en la Tesis he tenido una participación activa tanto en el diseño experimental, realización de los experimentos, redacción de los manuscritos publicados y/o en preparación y en la formación de recursos humanos.



Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay

Kevin Yaneselli, Valeria Campbell, Agustina Algorta, Clara Bonfiglio, Javier Mirazo, Sofía Fernández, Mauro Ríos, Silvia Llambí, Jacqueline Maisonnave

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54 N° 209 - 3 (2018) 14-19
DOI: 10.29155/VET.54.209.3

Los principales aportes de este trabajo son:

- Se consiguió el aislamiento y caracterización *in vitro* de las AD-MSCs de origen canino, equino y felino convirtiéndose en el trabajo pionero a nivel nacional para el conjunto de las especies domésticas.
- Se generó un biobanco de MSCs proveniente de animales doméstico que permitirá el desarrollo de nuevas investigaciones y/o el desarrollo terapéutico en medicina veterinaria.

Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay

Isolation and characterization of canine, equine and feline mesenchymal stem cells in Uruguay

Kevin Yaneselli¹, Valeria Campbell^{1,3}, Agustina Algorta^{1,2}, Clara Bonfiglio¹, Javier Mirazo³, Sofía Fernández¹, Mauro Ríos¹, Silvia Llambí⁴, Jacqueline Maisonnave^{1*}

¹Área Inmunología, Departamento Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacés 1550, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria, Lasplacés 1550, Montevideo, Uruguay.

³Departamento Equinos, Facultad de Veterinaria, Lasplacés 1550, Montevideo, Uruguay.

⁴Departamento Genética y Mejoramiento Animal, Facultad de Veterinaria, Lasplacés 1550, Montevideo, Uruguay.

* jacmaiso@gmail.com

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54
Nº 209 - 3 (2018) 14-19

DOI: 10.29155/VET.54.209.3

Recibido : 13/10/2017
Aceptado: 12/04/2018

Resumen

Las células madre mesenquimales (CMM) presentan gran interés en veterinaria por su potencial uso en medicina regenerativa. Este interés se debe a que presentan dos atractivas características, una es el poder promover la regeneración tisular y la segunda es poseer la capacidad de inmunomodulación, además, se pueden extraer fácilmente de animales adultos. El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento y caracterización *in vitro* de las CMM derivadas de tejido adiposo (TA) provenientes de las especies canina, equina y felina. Se consiguió aislar CMM-TA provenientes de 5 caninos, 4 equinos y 6 felinos. Las células de las tres especies mostraron capacidad de formar colonias fibroblastoides y tridiferenciación *in vitro* y fue posible criopreservarlas. En conclusión, se logró el aislamiento y caracterización de las CMM de las tres especies. Además, se generó un banco de CMM de origen animal criopreservadas con el propósito de futuras aplicaciones terapéuticas en medicina veterinaria y/o para otros estudios *in vitro*.

Palabras clave: células madre mesenquimales, canino, equino, felino.

Summary

Mesenchymal stem cells (MSCs) are of great interest in veterinary medicine due to their potential use in regenerative medicine. The attractive characteristics are the ability to promote tissue regeneration, to immunomodulate and easiness of extraction from adult animals. The objective of the present work was the isolation and *in vitro* characterization of adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs) of canine, equine and feline species. The AD-MSCs from 5 canines, 4 equines and 6 felines, were isolated. The cells of each species showed the capacity of forming fibroblast colonies, tridifferentiation *in vitro* and cells were cryopreserved. In conclusion, it was possible to isolate and *in vitro* characterize AD-MSCs. A bank of cryopreserved animal MSCs was created, for future therapeutic applications in veterinary medicine and other *in vitro* studies.

Keywords: mesenchymal stem cells, canine, equine, feline

Introducción

Las células madre mesenquimales (CMM), conocidas en la literatura internacional como MSCs (del inglés, *mesenchymal stem cells*), son una población proveniente de varios tejidos de individuos adultos y anexos embrionarios que tiene la capacidad de diferenciarse en células del linaje mesodérmico (multipotencialidad) como: adiposo, cartilaginoso, óseo, músculo estriado (Bourin y col., 2013). Una de las fuentes más populares para la obtención de CMM es el tejido adiposo (TA), debido a su fácil extracción y gran cantidad de células obtenidas (Strem y col., 2005). En el caso de caninos y felinos la extracción generalmente es realizada por biopsia de la zona abdominal a nivel subcutáneo o visceral (Gómez y col., 2015; Guercio y col., 2013; Requicha y col., 2012). En cambio, en equinos la extracción es realizada en la mayoría de las descripciones a nivel subcutáneo en la base de la cola (Alipour y col., 2015; Vidal y col., 2007). Una vez aisladas las células del TA deben cumplir con ciertos criterios internacionalmente aceptados para poder denominarse como CMM, para humanos deben presentar adherencia al plástico, poseer morfología fibroblástica, presentar determinados marcadores de superficie y poseer la capacidad de tridiferenciarse *in vitro* en los linajes: adiposo, cartilaginoso y óseo, en cambio en animales domésticos las exigencias son menores (Bourin y col., 2013). Por último, a nivel nacional en medicina veterinaria, hay escasas descripciones y/o incompleta caracterización de las CMM-TA en caninos (Yaneselli y col., 2013; Yaneselli y col., 2018), en equinos (Fernández y Ríos, 2016) y en felinos (Algorta y col., 2017). Por lo tanto, surge el objetivo del presente trabajo de aislar y caracterizar *in vitro* las CMM-TA de caninos, equinos y felinos.

Materiales y métodos

Extracción de TA

a) Caninos y Felinos

Se utilizaron como donantes 5 caninos (*Canis familiaris*) y 6 felinos (*Felis catus*), el TA fue obtenido de hembras saludables, destinadas a ovariectomía de rutina, raza mestiza, edad de 1-5 años. Luego de la incisión de piel, se retiraron 0,5-4 gramos de TA de origen subcutáneo y luego de atravesar los planos musculares se colectó de origen visceral (zona periovárica y/o intrabdominal). El TA fue depositado en tubos estériles con el medio de transporte (MT): *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) bajo en glucosa, 10% suero fetal bovino (SFB) y 2% antibiótico (penicilina/estreptomicina) y procesado en un tiempo máximo de 24 h. El protocolo de extracción contó con la previa autorización de la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA), CEUAFVET PI N° 13/12 y CEUA n° 144.

b) Equinos

Fueron tomadas 4 muestras *post-mortem* de equinos (*Equus caballus*) adultos saludables sacrificados con destino a frigorífico.

Cuando se obtenía la media res, resultante del proceso de faena, se tomó una muestra de la zona posterior en la base de cola. La toma de muestra se realizó con pinza y tijera quirúrgica estéril, tomando entre 5-10 gramos de TA y transportado bajo refrigeración (4-8 °C) en tubo estéril con MT y procesada en un tiempo máximo de 24 h.

Aislamiento de CMM-TA

El protocolo fue adaptado de lo descrito por Yaneselli (Yaneselli y col., 2018), brevemente, el TA se cortó en trozos con pinza y tijera estéril, lavado dos veces con solución tampón fosfato salino. Luego, fue sometido a una digestión enzimática durante 20-40 minutos a 37 °C en una solución de DMEM bajo en glucosa con 0,1 mg/ml de collagenasa tipo I. Posteriormente, se centrifugó a 700g durante 10 minutos, y por último, el pellet se resuspendió y sembró en un frasco de cultivo T25. El medio de crecimiento (MC) para el aislamiento utilizado fue compuesto por DMEM bajo en glucosa, 20% suero fetal bovino (SFB) y 2% antibiótico (penicilina/estreptomicina).

Cultivo y criopreservación de las CMM

Las células fueron sembradas en botellas de cultivo con MC e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Diariamente se evaluó la morfología y el crecimiento celular, cada 48 h se cambió el MC. Cuando llegaron al 80-90% de confluencia se realizaron sucesivos pasajes hasta el cuarto (P₄). El MC para los P₁-P₄ tenía una concentración de SFB diferente según la especie, en caninos y equinos se utilizó un 10% y 15% para felinos. Para la criopreservación, las células una vez que alcanzaban una confluencia de 80-90% fueron levantadas con tripsina-EDTA y contadas, centrifugadas a 700 g durante 10 min, posteriormente resuspendidas en 1 mL del medio de criopreservación compuesto por: 95% de SFB y un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenadas a -80°C.

Caracterización de las CMM

a) Unidades formadoras de colonias fibroblastoides (UFC-F)

Para comprobar el poder clonogénico de las CMM-TA entre los P₂-P₄, las mismas fueron sembradas a una concentración de 1×10^3 células/hoyo, por triplicado, en placas de cultivo celular de 6 hoyos, adaptado del protocolo de Guercio (Guercio y col., 2013). Se utilizó el MC correspondiente para cada especie y cada 3 o 4 días se realizaba el cambio de medio. Transcurridas las 2 semanas los cultivos fueron fijados con metanol frío (-20 °C) y teñidos con Giemsa.

b) Tridiferenciación *in vitro*

Las CMM-TA entre P₂-P₄ fueron sembradas a una concentración de $9,4 \times 10^3$ células/hoyo en placas de cultivo celular de 24

hoyos, por duplicado. Después de 24-48 horas de siembra se cambia el MC sin antibiótico. Fueron mantenidas por 3 semanas con los medios de inducción y se realizaron los cambio de medio cada 3-4 días, además se sembraron controles negativos (sin inducir) con el MC utilizado para la propagación *in vitro*. Por último, una vez terminado el periodo de inducción las células eran fijadas con 4% de paraformaldehído y teñidas con Oil Red O, Alcian Blue o Alizarin Red S, dependiendo a que linaje fueron inducidas.

Los medios de inducción a linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico fueron adaptados de lo descrito por Yaneselli (Yaneselli y col., 2018), para caninos, Alipour (Alipour y col., 2015), para equinos y para felinos lo descrito por Quimby (Quimby y col., 2013).

Resultados

Aislamiento, propagación *in vitro* y criopreservación de las CMM-TA

Fue posible aislar y propagar *in vitro* las CMM-TA de todas las muestras de caninos, equinos y felinos. Al inicio del cultivo se encuentra baja cantidad de células con morfología fibroblástica-

ca y adherentes al plástico (Figura 1, A-C). A los 4-5 días, las primeras células adherentes comienzan a multiplicarse y a la semana llegaban a un 70-80% de confluencia, realizándose el pasaje celular a una superficie de cultivo mayor. Se consiguieron criopreservar CMM-TA de todas las especies entre los P₂-P₄ con una concentración de 0,5-1 x10⁶/mL.

Caracterización de las CMM-TA

Las CMM-TA presentaron la capacidad de formar colonias, lo cual se pudo ver en la prueba de UFC-F para todas las especies (Figura 1, D-F). Además, se observó que las células poseían la capacidad de diferenciarse *in vitro* en los linajes: adiposo, cartilaginoso y óseo (Figura 1, G-O). En la inducción adiposa fue observada una diferencia morfológica en las primeras semanas con presencia de vacuolas. Posteriormente, al finalizar la inducción fue confirmada la diferenciación (positivas a Oil Red O) observando la presencia de gotas lipídicas intracitoplasmáticas, indicando la diferenciación a pre-adipocito (Figura 1, G-I). Para el linaje cartilaginoso se pudo observar posterior a la inducción, la coloración azulada, positiva a Alcian Blue, que indicó la formación de matriz cartilaginosa (Figura 1, J-L). El linaje óseo en las primeras semanas de inducción se pudo observar cambios

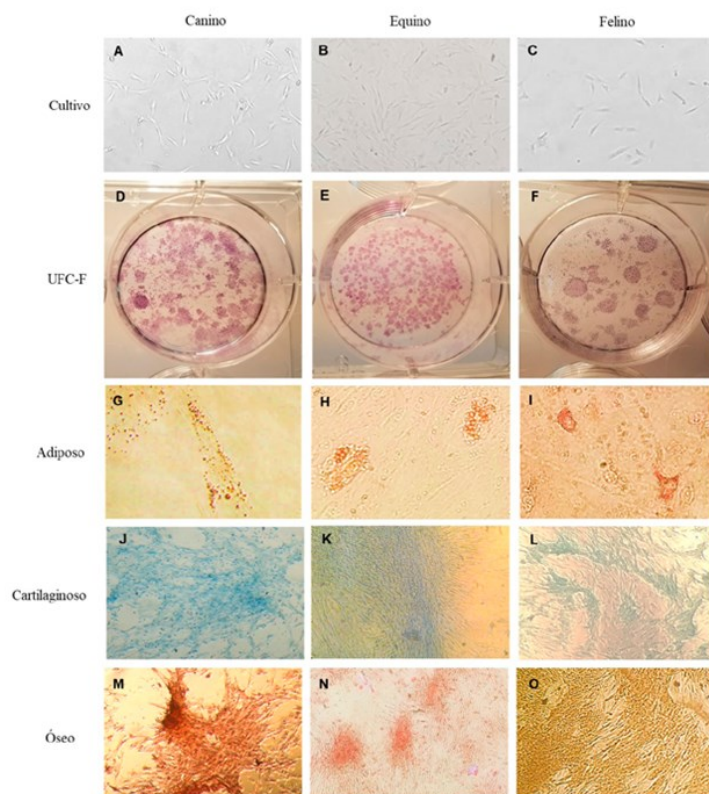


Figura 1. Imagen microscópica del cultivo celular de las CMM-TA 40x de las especies: **A** canina, **B** equina y **C** felina. Imagen macroscópica de UFC-F: **D**, **E** y **F** de las tres especies, respectivamente. Imagen microscópica de la prueba de tridiferenciación *in vitro* de las CMM-TA provenientes de caninos, equinos y felinos: **G**, **H** y **I**: diferenciación adipogénica 200x con la presencia de vacuolas lipídicas; **J**, **K** y **L**: diferenciación condrogénica 40x; **M**, **N** y **O**: diferenciación osteogénica 40x.

morfológicos y formación de matriz extracelular, que luego de la inducción se confirmó con la tinción roja (positiva a Alizarin Red S) la síntesis de matriz mineralizada (Figura 1, M-O).

Discusión

En nuestro trabajo fue posible el aislamiento y caracterización de CMM-TA de las fuentes subcutánea y visceral de caninos y felinos, coincidiendo con otros autores (Arzi y col., 2016; Clark y col., 2017; Guercio y col., 2013). El TA es una fuente de células muy atractiva debido a que los donantes son animales jóvenes, sanos y la ovariectomía es una cirugía de rutina. Asimismo, en equinos fue posible aislar CMM-TA de la base de la cola (región supraglútea) al igual que otros autores (Alipour y col., 2015; Vidal y col., 2007). Sin embargo, en nuestro trabajo la extracción de TA hecha *post-mortem* (animales destinados a faena) tiene la ventaja de no tener que disponer de donantes vivos.

Las células aisladas consiguieron adherirse al plástico, proliferar *in vitro* y se pudo comprobar su capacidad clonogénica a través de la prueba UFC-F para las tres especies. Coincidiendo con Friedenstein (Friedenstein y col., 1970), quienes destacaron esas características en su descubrimiento. Además, otros autores también han descrito este comportamiento en células provenientes de las especies canina (Guercio y col., 2013; James y col., 2017), equina (Alipour y col., 2015; Vidal y col., 2007) y felina (Martin y col., 2002).

En el presente trabajo, se utilizó el término de CMM para todas las especies, dado que se cumplieron las recomendaciones de la *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) para animales domésticos (Bourin y col., 2013), debido a que mostraron morfología fibroblástica, adherencia al plástico, capacidad de formar colonias y potencial de tridiferenciación *in vitro* (linajes: adiposo, cartilaginoso y óseo). El criterio de referencia para estas especies es la prueba de tridiferenciación *in vitro* (Dominici y col., 2006). Sin embargo, los primeros trabajos sobre terapia celular en especies domésticas comenzaron por describir aplicaciones terapéuticas de "CMM" sin una adecuada caracterización (Arinze y col., 2003; Bruder y col., 1998; de Mattos Carvalho y col., 2011; Pacini y col., 2007). Posteriormente, en consecuencia, a las recomendaciones de la ISCT aparecieron trabajos enfocados en la caracterización celular de estas especies de interés veterinario (Clark y col., 2017; Hillmann y col., 2016; Kang y col., 2012). La importancia de la adecuada caracterización permite estandarizar las terapias celulares, ya que sin una mínima caracterización de las células utilizadas es difícil atribuirle los resultados beneficiosos a una población celular indefinida y también dificulta su reproducibilidad experimental (Bourin y col., 2013; Hoffman y Dow, 2016).

Para las CMM de origen humano las exigencias son mayores debido que también debe realizarse la inmunofenotipificación por citometría de flujo (Bourin y col., 2013). En cambio, para animales domésticos la inmunofenotipificación, queda en un plano secundario, debido a la escasa información que existe actualmente

de los marcadores adecuados para células caninas, equinas y felinas, sumado al difícil acceso a anticuerpos diseñados específicamente para dichas especies (Dominici y col., 2006; Hillman y col., 2016; Gómez y col., 2015; Screven y col., 2014).

En el presente trabajo nuestros resultados coincidieron con las anteriores descripciones a nivel nacional en cuanto a la morfología fibroblástica, adherencia al plástico, capacidad de formar colonias fibroblastoides (UFC-F) y la capacidad de diferenciación *in vitro* de las células estromales, pero con algunas diferencias según la especie. En el caso de caninos, nuestros resultados coinciden con la descripción de la morfología y capacidad de tridiferenciación de las CMM-TA de Yaneselli (Yaneselli y col., 2018), pero en esta última publicación no fue comprobada la capacidad de UFC-F. Por otra parte, algunos trabajos incluyen a la caracterización celular la inmunofenotipificación (Yaneselli y col., 2013; Yaneselli y col., 2018), la cual es exigida en células humanas y solo recomendada para las provenientes de especies domésticas. En la especie equina coincidimos con los resultados de Fernández y Ríos (Fernández y Ríos, 2016), en el aislamiento y la morfología de las células estromales mesenquimales. Sin embargo, ellos solo describen la diferenciación al linaje óseo y cartilaginoso *in vitro*, mientras que, en este trabajo si se pudo comprobar la tridiferenciación.

Conclusiones

Por primera vez a nivel nacional se describe el aislamiento y la caracterización recomendada internacionalmente de las CMM-TA provenientes de caninos, equinos y felinos. Las células presentaron morfología fibroblástica, adherencia al plástico, capacidad clonogénica y de tridiferenciación *in vitro*. Por último, se ha generado un banco de células madre criopreservadas de origen animal, las cuales pueden ser utilizadas para otros estudios de caracterización *in vitro* o también con fines terapéuticos en medicina veterinaria.

Referencias

1. Algorta A, Bonfiglio C, Artigas R, Yaneselli K, Llambi S, Maisonnave J. (2017). Caracterización de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de felinos. X Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay, pp. 170-171.
2. Alipour F, Parham A, Mehrjerdi H, Dehghani, H. (2015). Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell J* 16:456-465.
3. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. (2003). Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*

- 85:1927-1935.
4. Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJ, Kol A, Walker NJ, Badgley MR, Fazel N, Murphy WJ, Vapniarsky N, Borjesson DL. (2016). Therapeutic efficacy of fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. *Stem Cells Transl Med* 5:75-86.
5. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the international society cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641-648.
6. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects the effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80:985-996.
7. Clark KC, Fierro FA, Ko EM, Walker NJ, Arzi B, Tepper CG, Dahlenburg H, Cicchetto A, Kol A, Marsh L, Murphy WJ, Fazel N, Borjesson DL. (2017). Human and feline adipose-derived mesenchymal stem cells have comparable phenotype, immunomodulatory functions, and transcriptome. *Stem Cell Res Ther* 8:1-16.
8. de Mattos Carvalho A, Alves AL, de Oliveira PG, Álvarez LE, Amorim RL, Hussni CA, Deffune E. (2011). Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J Equine Vet Sci* 31:26-34.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
10. Fernández S, Ríos M. (2016). Comparación de suero fetal bovino y lisado plaquetario alogénico en el cultivo de células madre mesenquimales equinas. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
11. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393-403.
12. Gómez MC, Qin Q, Biancardi MN, Galiguis J, Dumas C, MacLean RA, Wang G, Pope CE. (2015). Characterization and multilineage differentiation of domestic and black-footed cat mesenchymal stromal/stem cells from abdominal and subcutaneous adipose tissue. *Cell Reprogram* 17:376-392.
13. Guercio A, Di Bella S, Casella S, Di Marco P, Russo C, Piccione G. (2013). Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int* 37:789-798.
14. Hillmann A, Ahrberg AB, Brehm W, Heller S, Josten C, Paebst F, Burk J. (2016). Comparative characterization of human and equine mesenchymal stromal cells: a basis for translational studies in the equine model. *Cell Transplant* 25:109-124.
15. Hoffman AM, Dow SW. (2016). Concise review: stem cell trials using companion animal disease models. *Stem Cells* 34: 1709-1729.
16. James AW, Zhang X, Crisan M, Hardy WR, Liang P, Meyers CA, Lobo S, Lagishetty V, Childers MK, Asatrian G, Ding C, Yen YH, Zou E, Ting K, Peault B, Soo C. (2017). Isolation and characterization of canine perivascular stem/stromal cells for bone tissue engineering. *PLoS One* 12(5):e0177308.
17. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Woo HM, Kim WH, Kweon OK. (2012). Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci* 13:299-310.
18. 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.
19. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng* 13:2949-2955.
20. Quimby JM, Webb TL, Habenicht LM, Dow SW. (2013). Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther* 4:1-12.
21. Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME. (2012). Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev* 8:1211-1222.
22. Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC, Borjesson DL, Zhu M. (2014). Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol* 116:21-31.
23. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132-141.
24. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* 36:613-622.
25. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Erickson K. (2013). Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Veterinary*

26. Yaneselli KM, Kuhl CP, Terraciano PB, Oliveira FLS, Pizato SB, Pazza K, Magrisso AB, Torman V, Rial A, Moreno M, Llambí S, Cirne-Lima EC, Maisonnave J. (2018). Comparison the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers. *J Vet Sci* 19:13-20.



Comparison the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers

Kevin M. Yaneselli, Cristiana P. Kuhl, Paula B. Terraciano, Fernanda S. de Oliveira, Sabrina Beal Pizzato, Kamila Pazza, Alessandra B. Magrisso, Vanessa Torman, Analía Rial, María Moreno, Silvia Llambí, Elizabeth Cirne Lima, Jacqueline Maisonnave.

J Vet Sci 2018, 19(1), 13-20

<https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.1.13>

Los principales aportes de este trabajo son:

- El inmunofenotipo de las AD-MSCs Sc y Vs fue similar para los marcadores evaluados entre ambas fuentes y presentaron el siguiente perfil CD44+, CD90+ y CD45-.
- Las células de Sc presentaron con mayor longevidad la capacidad de tridiferenciación *in vitro* en comparación a las Vs. Además, se observó que los pasajes sucesivos tuvieron un efecto negativo sobre la multipotencialidad *in vitro* para ambos orígenes de MSCs.
- Las células provenientes de la fuente Sc presentaron mayor capacidad de síntesis de matriz ósea *in vitro* en comparación a la Vs.

Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers

Kevin M. Yaneselli¹, Cristiana P. Kuhl², Paula B. Terraciano², Fernanda S. de Oliveira², Sabrina B. Pizzato², Kamila Pazza², Alessandra B. Magrisso², Vanessa Torman³, Analía Rial⁴, María Moreno⁴, Silvia Llambí⁵, Elizabeth Cirne-Lima², Jacqueline Maisonnave^{1,*}

¹Laboratory of Immunology, Department of Microbiological Science, Faculty of Veterinary, ⁴Laboratory for Vaccine Research, Department of Biotechnology, Instituto de Higiene, Faculty of Medicine, and ⁵Laboratory of Genetics, Faculty of Veterinary, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay

²Laboratory of Embryology and Cellular Differentiation, and ³Biostatistics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

Mesenchymal stem cells (MSCs) have desirable characteristics for use in therapy in animal models and veterinary medicine, due to their capacity of inducing tissue regeneration and immunomodulation. The objective of this study was to evaluate the differences between canine adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs) extracted from subcutaneous (Sc) and visceral (Vs) sites. Surface antigenic markers, *in vitro* differentiation, and mineralized matrix quantification of AD-MSCs at different passages (P₄, P₆, and P₈) were studied. Immunophenotypic analysis showed that AD-MSCs from both sites were CD44⁺, CD90⁺, and CD45[−]. Moreover, they were able, *in vitro*, to differentiate into fat, cartilage, and bone. Sc-AD-MSCs preserve *in vitro* multipotentiality up to P₈, but Vs-AD-MSCs only tri-differentiated up to P₄. In addition, compared to Vs-AD-MSCs, Sc-AD-MSCs had greater capacity for *in vitro* mineralized matrix synthesis. In conclusion, Sc-AD-MSCs have advantages over Vs-AD-MSCs, as Sc AD-MSCs preserve multipotentiality during a greater number of passages, have more osteogenic potential, and require less invasive extraction.

Keywords: canine, immunophenotyping, mesenchymal stem cells, multipotent plasticity

Introduction

Adult-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are a non-specialized lineage, with limited ability for auto-renovation and plasticity. Their multipotentiality allows them to differentiate into lineages derived from the same germinal line, mesoderm [5,30], and also to differentiate into other non-mesodermal lineages [1,26]. Since a report by Caplan [6], which proposed the use of MSCs in orthopedics, the interest in MSCs has increased due to their potential for use in regenerative medicine. The increased interest is due to the attractive characteristics of MSCs: multipotentiality [11], immunomodulation [2,19], angiogenesis [14,33], homing to the site of inflammation [7,32], and antimicrobial effect [13,20]. All of the aforementioned characteristics indicate the great therapeutic potential of MSCs in human and veterinary medicine. Furthermore, domestic animals have similar pathologies to

humans, so they can be used as animal models [31].

In order to be able to compare results between researchers, MSCs used in therapy, must be characterized, following the recommendations of the International Society of Cellular Therapy (ISCT). The MSCs must have a fibroblastic morphology, be adherent to plastic, express mesenchymal stromal markers, and have *in vitro* tri-differentiation capacity [5]. Different surface markers, such as CD29, CD44, and CD90 have been used to characterize canine adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs) [11,24,30]. Other markers, such as hematopoietic markers CD34 and CD45 need to be absent or have very low expression [11,24]. There is limited availability of flow cytometry reagents specific for canines, thus, in most of the cases, human- or mouse-specific antibodies that have cross-reactivity with canines are used. However, one problem is that cross-reactivity results in different proportions of positive cells for a variety of markers; thus, there is controversy over

Received 28 Dec. 2016, Revised 25 Apr. 2017, Accepted 5 May 2017

*Corresponding author: Tel: + 598-26281303; Fax: + 598-26280130; E-mail: jacmaisoi@gmail.com

Journal of Veterinary Science • © 2018 The Korean Society of Veterinary Science. All Rights Reserved.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

pISSN 1229-845X
eISSN 1976-555X

which surface markers are most appropriate for canine MSCs [22,24].

Initially, the most common MSC source was bone marrow (BM) [25], but currently, the adipose tissue (AT) source, described for the first time by Zuk *et al.* [35], is more commonly studied. AD-MSCs have several advantages over BM-derived MSCs, as the use of AT results in more MSCs being obtained and the AT-derived cells have greater proliferative ability [3,22]. Moreover, the AT extraction method is less invasive [11] and AD-MSCs conserve their undifferentiated state during more passages [15]. These characteristics have motivated researchers to focus on AT as a safe and convenient source of MSCs for use in regenerative medicine [9,11]. Several studies in humans and animal models have compared the characteristics of AD-MSCs derived from different anatomical sites, such as those in subcutaneous (Sc) and visceral (Vs) areas. Multipotentiality studies on AD-MSCs of both origins have shown contrasting results regarding differentiation capacity and *in vitro* propagation ability [4,21,22]. There are few *in vitro* studies comparing immunophenotype and multipotentiality characteristics of canine MSCs derived from different AT sites at different passage numbers. Our hypothesis is that different AT origins and passage numbers have an effect on MSC properties. The objective of the present study was to evaluate, *in vitro*, differences in immunophenotype and multipotentiality over serial passages of canine AD-MSCs derived from Sc and Vs sites.

Materials and Methods

Animals

The AT samples were extracted from 5 healthy female canines, 5 to 11 months old, in interestrus. Abdominal AT, was extracted from two different sites, flank Sc and periovaric Vs, of canines submitted to ovariectomy. This study was carried out, in strict accordance with the recommendations of the Committee on Ethics of Animal Experiments of Brazil "Comitê de ética no uso de animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA)" under approval number 130510.

AT collection

Canines were anesthetized with intravenous propofol (Eurofarma Laboratórios, Brazil; 6 mg/kg) and intramuscular tramadol (Laboratório Teuto Brasileiro, Brazil; 4 mg/mL) and anesthesia was maintained through intubation with 2% isoflurane (Instituto Bioquímico Indústria Farmacêutica, Brazil). The surgery area was trichotomized and embrocated with iodophore solution and isolated with surgical fields. A midline incision was performed on the skin and Sc-AT was extracted from the edges of the surgical wound. After removal of the ovaries, the Vs-AT was extracted from the periovarian region.

AD-MSC isolation and expansion

Approximately 2 to 4 g of AT were cut into small pieces and washed in phosphate buffered saline (PBS) twice. Then, the pieces were submitted to enzymatic digestion for 40 min at 37°C, in a solution of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Gibco, USA) and 0.1 mg/mL of type I collagenase (Gibco, USA). The digested material was centrifuged at $700 \times g$ for 10 min, and the pellet was resuspended in growing media consisting of DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Brazil), and 1% antibiotic (penicillin 1 Unit/mL, streptomycin 1 µg/mL, and L-glutamine 2.92 µg/mL; Gibco, USA) and then seeded in tissue culture flasks (Greiner, Germany). The cultures were incubated at 37°C with 5% CO₂, and every 48 h, the medium was changed. When 80% to 90% confluence was attained, the cultures were treated with trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.005% (Gibco, USA) and subcultured.

Immunophenotyping of AD-MSCs

The Sc- and Vs-AD-MSC phenotypes were evaluated, at passages P₄, P₆ and P₈, by performing flow cytometry as previously described by Yaneselli *et al.* [34]. Briefly, cells were washed with PBS (Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free) containing 0.5 mM EDTA and 0.5% FBS (FACS-EDTA). Then, cells were immunostained for 30 min at 4°C in the dark with 10 µL of each of allophycocyanin-conjugated anti-CD44 (clone IM7; Leinco Technologies, USA) and fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD45/LCA (CD45RO, clone UCHL1; Acris Antibodies, USA) antibodies, as well as 20 µL of phycoerythrin-conjugated anti-CD90 antibody (THY1, clone 5E10; antibodies-online, USA). After incubation, cells were washed with FACS buffer. Acquisition was performed by using a FACS Canto II system (BD Biosciences, USA) with 5,000 events per sample. The obtained data were analyzed by using FlowJo software (Tree Star, USA) and categorized according to the method of Takemitsu *et al.* [27].

Cell differentiation assay

The AD-MSCs at P₄, P₆, and P₈ were seeded in duplicate at 9.4×10^3 cells/well in CELLSTAR 24-well plates (Greiner), and 24 to 48 h later, they were *in vitro* differentiated with growing media, DMEM low glucose supplemented with 10% FSB and without antibiotic, according to the method of Vieira *et al.* [30]. Cells were maintained for 21 days with a media change every 3 to 4 days. Briefly, for adipogenic differentiation: 5 µM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich, USA), 60 µM indomethacin (Sigma-Aldrich), 1 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich), and 5 µg/mL insulin (Eli Lilly and Company, USA) were added to the growing media. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min and Oil Red O (Sigma-Aldrich) was used to stain the lipid drops. For chondrogenic differentiation: 50 µM ascorbic acid (Sigma-

Aldrich), 10 ng/mL transforming growth factor- β (Sigma-Aldrich), and 6.25 μ g/mL insulin were added to the growing media. Then, cells were fixed and stained with Alcian Blue (Sigma-Aldrich) to detect the presence of cartilage matrix. For osteogenic differentiation: 1 μ M dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), and 50 μ M ascorbic acid were added to the growing media. Then, they were fixed and stained with Alizarin Red (Sigma-Aldrich) to detect mineralized matrix.

Mineralized matrix quantification

Nine random microscopic images (640×480 pixels, Nikon TE2000-U; Nikon, Japan) were taken at passages P₄, P₆, and P₈ of Alizarin Red-stained Sc- and Vs-origin tissue cultures that had been induced to bone differentiation. Images were analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health, USA), which designated pixel status according to the intensity of the red color of the mineralized matrix.

Statistical analysis

The generalized estimating equation within the IBM SPSS Statistics software (ver. 23.0; IBM, USA) was used to evaluate the potentials of adipogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation and the mineralized matrix synthesis capacity. Results are expressed as mean $\pm$ SD values. Differences were

considered significant when $p < 0.05$, and values between $p > 0.05$ and $p < 0.10$ were considered as indicative of a tendency.

Results

Characteristic of AD-MSCs

Cells from both sites had fibroblastic-like morphology, adhered to plastic, and formed homogenous monolayers. AD-MSCs attained 80% confluence at 5 to 7 days. Immunophenotyping of AD-MSCs was assessed at P₄, P₆, and P₈, with similar antigenic surface expression observed among the average passages from the same origin. Both Sc- and Vs-AD-MSCs were positive for CD44 ($98.9\% \pm 0.6\%$ and $97.4\% \pm 2.3\%$, respectively). Regarding CD90 expression, $72.3\% \pm 17.3\%$ of Sc and $71.4\% \pm 15.8\%$ of Vs cells were positive for this marker. Only $6.0\% \pm 4.5\%$ of Sc and $4.8\% \pm 2.7\%$ of Vs cells were positive for CD45, indicating that most cells of both lineages were negative for this hematopoietic marker. In summary, most of the AD-MSCs obtained, regardless of their origin, were positive for CD44 and CD90, with few cells expressing CD45 (Fig. 1).

Adipocyte and chondrocyte differentiation potential

AD-MSCs of both origins were able to differentiate *in vitro* into adipose and cartilage lineages (panels A and B in Fig. 2

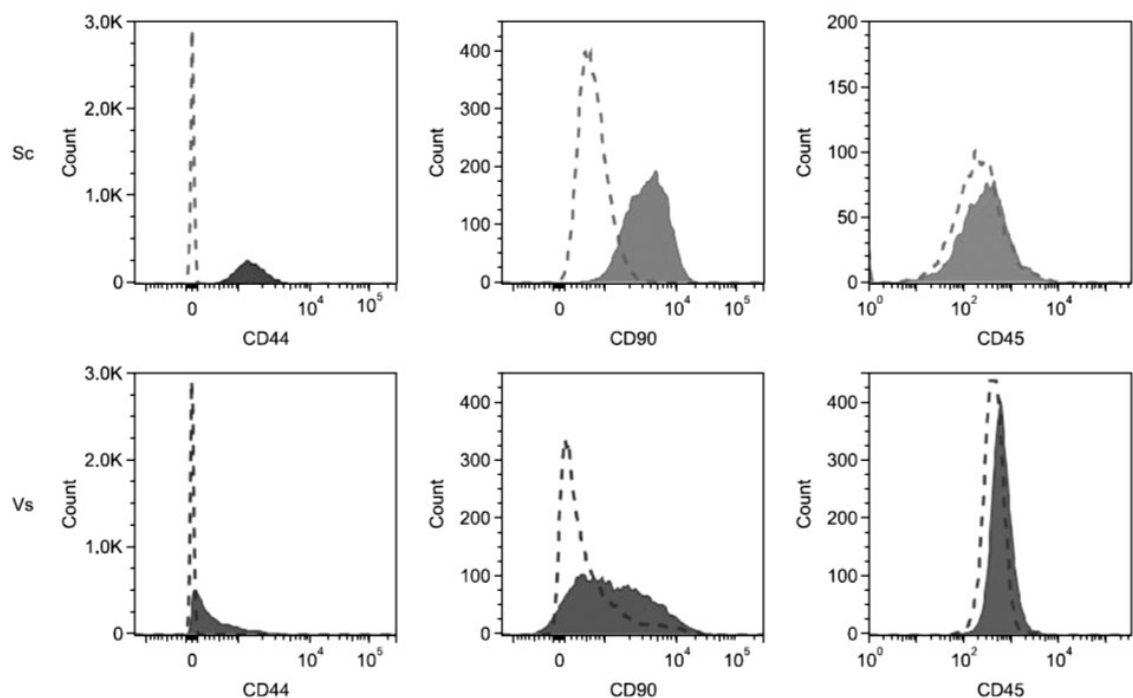


Fig. 1. Expressions of CD44, CD90, and CD45 on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells of subcutaneous (Sc) or visceral (Vs) origin were assessed by performing flow cytometry ($n = 2$). Data are representative of analyzed passages.

and panels G and H in Fig. 2). On adipose induction, morphological changes were observed in the first week. At week 3, differentiation was confirmed by the presence of red staining (Oil Red O-positive) of the intracellular lipid drops. At

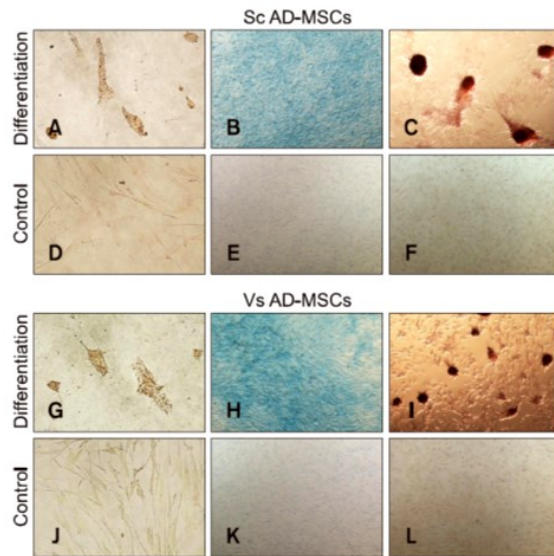


Fig. 2. Tri-differentiation microscopic images of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) at P_2 *in vitro* ($n = 5$). Adipogenic differentiation images at $400\times$ (intracellular lipid vacuoles) for subcutaneous (Sc) and visceral (Vs) (A and G). Chondrogenic differentiation images at $40\times$ (B and H). Osteogenic differentiation images at $40\times$ (C and I). Negative controls are shown in images D-F and J-L.

21 days, the blue color (Alcian Blue-positive) of the chondrogenic-induced cells is due to the presence of glycosaminoglycans. Negative control cells showed no morphological changes and no affinity for dyes, in accordance with their undifferentiated state. Adipogenic and chondrogenic potentials of both lineages (Sc and Vs) diminished with the increase in passages (panels A and B in Fig. 3). Also, Sc cells on passages P_4 , P_6 , and P_8 showed higher potential for *in vitro* differentiation than Vs cells; however, these differences were only tendencies (adipose $p = 0.091$, cartilage $p = 0.095$). Furthermore, Sc cells showed multipotentiality up to P_8 , but with a gradual loss of this characteristic and a marked decrease at P_6 . The majority of the Sc cells grew very little or stopped growing at P_8 (category “non-growth”). On the other hand, the Vs-origin cells had plasticity differentiation only up to P_4 .

Osteogenic differentiation potential

The osteogenic-induced cells, at one week after induction, exhibited morphological changes, and presence of a mineralized matrix was confirmed by red staining (Alizarin Red S-positive) (panels C and I in Fig. 2). Sc cells at passages P_4 , P_6 , and P_8 showed a higher proportion of *in vitro* differentiation into this lineage than that shown by the Vs-derived cells, but the differences were not significant, only showing a tendency (bone $p = 0.091$). When this osteogenic differentiation potential was analyzed for both cell origins (Sc and Vs together), there was a negative effect with an increase in passages, but the effect was insignificant (panel C in Fig. 3). The amount of mineralized matrix quantification was compared at P_4 of cells from both origins, and the Sc-AD-MSCs produced more mineralized matrix than Vs-AD-MSCs ($10.67\% \pm 2.76\%$ vs. $7.41\% \pm 2.18\%$, $p < 0.05$) (Fig. 4). In addition, between P_4

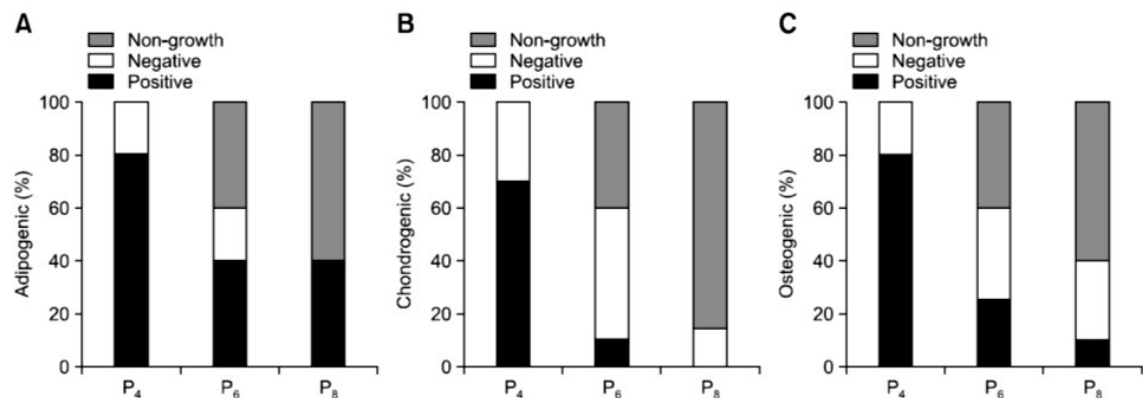


Fig. 3. Evaluation of *in vitro* differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells from both extraction sites at different passages ($n = 5$). (A) Adipogenic differentiation. (B) Chondrogenic differentiation. (C) Osteogenic differentiation. The “non-growth” category exhibits an initial gradual increase, becoming abrupt between P_6 to P_8 . The multipotentiality had a negative effect on adipose ($p < 0.001$) and cartilage ($p < 0.01$) lineages, but the bone lineage showed a marked tendency with the increase of passages ($p = 0.054$).

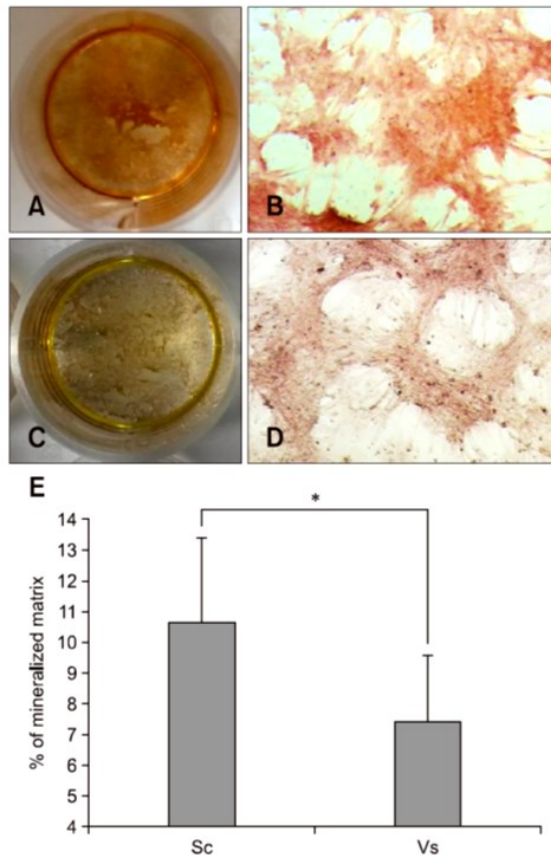


Fig. 4. *In vitro* bone matrix synthesis capacity of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells of subcutaneous (Sc) and visceral (Vs) origins at P₄ (n = 5). Macroscopic and microscopic (40×) images of Sc (A and B) and Vs (C and D) cells. The Sc cells showed a greater capacity for matrix synthesis than that shown by Vs cells (E). **p* < 0.05.

and P₈, cells of the Sc lineage showed a significant progressive decrease in mineralization matrix ($10.67\% \pm 2.76\%$ vs. $7.44 \pm 1.96\%$ vs. $2.42 \pm 2.73\%$, *p* < 0.001) (Fig. 5). It was not possible to evaluate the Vs mineralization matrix potential, because of the marked loss of osteogenic potential in sequential passages of Vs cells.

Discussion

In this study, extraction of AT was performed in a group of young canines undergoing ovariectomy, which is a routine surgery and is usually done on healthy and young animals. It is relatively easy to obtain great amounts of AT for AD-MSCs during that surgery without significant risk for the tissue donor, thus making it such canines a suitable donor population to build

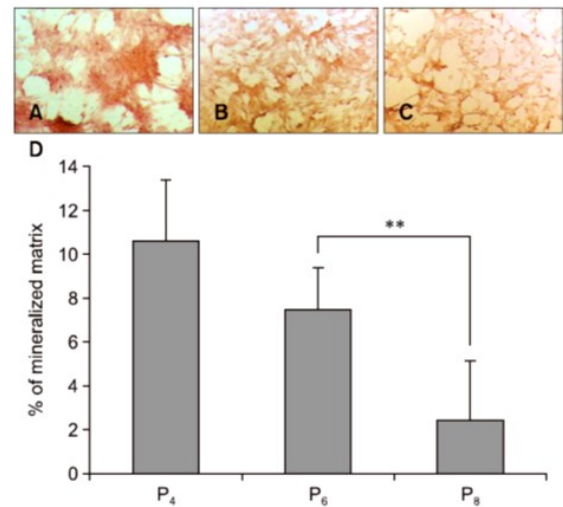


Fig. 5. Comparison of *in vitro* bone matrix synthesis capacity of subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells at different passages (n = 5). Microscopic images (40×) at P₄ (A), P₆ (B), and P₈ (C). A significant difference is detected between P₆ and P₈ (D), ***p* < 0.001.

a bank of cryopreserved MSCs, which supports comments by other researchers [16,17]. In compliance with international recommendations [5], we used the name MSC for cells of both origins that exhibited fibroblastic morphology, plastic-adherence, MSC marker positivity, and *in vitro* tri-differentiation (adipocytes, chondrocytes, and osteoblasts) ability. AD-MSCs of both origins, Sc and Vs, were positive for CD44 and CD90 and negative for CD45. Other authors have described similar phenotypes in canine AD-MSCs [16,24,27,30]. Under our study conditions, more than 90% of the AD-MSCs of Sc and Vs origin expressed CD44, which is similar to results presented by other authors [15,27]; although Martinello *et al.* [16] described a lower CD44 expression level (88% for Vs-AD-MSCs). In contrast, we showed that more than 70% of both AD-MSCs lineages expressed CD90, but other authors have described higher (87% [30]) or lower (35% [16] and 22.55% [27]) expressions. Screven *et al.* [24] reported higher individual variations and described two categories: one between 10% to 40% expression and other more than 40%. The differences in these studies may be due to the fact that antibodies are not specific for canine markers as they have been designed for mice or humans antigens [22,24,27]. Another reason could be that the cells were evaluated at different passages and were from different origins: Takemitsu *et al.* [27] worked with AD-MSCs of inguinal Sc origin on P₂, Martinello *et al.* [16] with AD-MSCs of periovaric Vs at passages P₃–P₆, and Screven *et al.* [24] on Sc AD-MSCs at P₃–P₅. These variations in the expression of CD90 have been described in canines [24,27] and

other species [8,12,18,23]. This heterogeneity of expression indicates that anti-CD90 antibodies, designed for humans and mice, may not be appropriate for immunophenotyping canine MSCs. Nevertheless, we observed a high and conserved expression of CD44 at different passages, which supports the results reported by other authors [11,27,30]. We observed a very low expression of CD45, as has also been reported by other authors [16,27,30], which is foreseeable as it is a hematopoietic cell marker.

Some authors have proposed using real-time polymerase chain reaction (PCR) to measure CD44 and CD90 mRNA as an method to avoid the problem of the limited availability of canine-specific MSCs antibodies [15,22]. By using flow cytometry, we observed that CD44 and CD90 are expressed at the surface up to P₈, similar to the expressions in humans up to P₁₀ reported by Baglioni *et al.* [4]. Nevertheless, contradictory results have been reported when using real-time PCR, as CD90 expression decreases at P₄ [22], while CD44 and CD90 decrease at P₇ [15].

In our work, Sc-origin cells showed a tendency for a higher proportion of differentiation than Vs-origin cells (adipose $p = 0.091$, cartilage $p = 0.095$, and bone $p = 0.091$). Other authors describe similar multipotentialities between those two origins [4,9]. The tendencies in our results might become differences if the study is repeated with more animals. In our study, adipose differentiation of canine Sc- and Vs-AD-MSCs, revealed few and small lipid vacuoles, similar as the results described by Vieira *et al.* [30]. Even though other authors do not express concern about these vacuole characteristics in the text, the pictures in their publications reveal very few lipid vacuoles [15,16]. On the other hand, it might not be a difference related to the species being studied, as Guercio *et al.* [9] have described canine cells having big and several lipid vacuoles, as reported in humans [4] and mice [28]. The different results observed may also be due to the formulations of the induction media used. Moreover, it has been suggested that classical histochemical staining for detecting adipose differentiation should be considered in the measurement of genic expression biomarkers [5,15].

Regarding the quantification of *in vitro* mineralized matrix, significant differences were observed, with the Sc-AD-MSCs showing a higher mineralized matrix percentage than the Vs-AD-MSCs ($10.67\% \pm 2.76\%$ vs. $7.41\% \pm 2.18\%$). Other researchers have reported similar results, Sc-derived cells had more gene expression of biomarkers (COL1A1 and RUNX2) of bone differentiation in canine [22] and humans AD-MSCs [3]. However, Baglioni *et al.* [4] did not find different capacities of mineralized matrix synthesis in human AD-MSCs from Sc and Vs sites at passages P₁-P₄. Results contrasting ours were obtained in rabbits by Peptan *et al.* [21] who reported a higher proportion of mineralized matrix in Vs than in Sc cells ($35.25\% \pm 6.36\%$ vs. $15.16\% \pm 3.51\%$). These study differences could be

due to the use of different species and/or passages as Peptan *et al.* [21] analyzed P₁ (not P₄) and the stain used was von Kossa (not Alizarin Red S). However, Kang *et al.* [11] reported differences in *in vitro* osteogenic potential but did not detect it *in vivo*, suggesting that to measure this potential in canines it is more appropriate to use an *in vivo* model.

Our results show that MSCs of Sc and Vs origins behave differently in regard to *in vitro* plasticity. The Vs lineage exhibited tri-differentiation up to P₄, while tri-differentiation in Sc cells was present up to P₈, with an accentuated reduction between P₆ and P₈. A loss of multilineage differentiation potential in subculturing has been observed for canine AD-MSCs by others [9,15]. In our results, the predominant category at P₈ was “non-growth”, which could be due to the cells entering senescence. Martinello *et al.* [16] described a marked decrease in telomerase activity in canine AD-MSCs from P₈ onward, indicating that cells started undergoing senescence. Requicha *et al.* [22] reported that, by assessing biomarker gene expression, canine AD-MSCs start losing multipotentiality at P₃. Other authors have reported that canine cells conserve plasticity up to P₆ [9,15], which is in agreement with our results showing that the Sc lineage underwent a large decrease between P₆ and P₈. Nevertheless, Zuk *et al.* [35] showed that human cells start undergoing senescence at P₁₅, showing that there are differences between species in the longevity of cultures. We believe that it is clinically important and relevant for regenerative therapeutics in animal model or veterinary medicine, to determine at what passage the MSCs conserve their stemness capacity. Such beliefs have been expressed by others [9,15].

We observed a difference in plasticity of AD-MSCs based on AT origin, with Sc-derived MSCs differentiating at higher passages than Vs MSCs. The hypothesis that cells have memory of the site of extraction, might explain the differences detected in our study, differences that support observations reported by others [3,9,22]. The basis of this hypothesis derives from the metabolism of glucose in a diabetes murine model, in which Sc-AT is more efficient than Vs-AT in glucose metabolism [10,29].

In conclusion, our results show that the Sc-AD-MSC lineage has advantages over the Vs-AD-MSC lineage due to Sc-AD-MSCs having tri-differentiation capacity at higher passages, a higher *in vitro* bone mineralized matrix synthesis capacity, and a less invasive method of AT extraction. Although working with Sc-AD-MSCs in culture is more practical and efficient than working with Vs-AD-MSCs, more research is necessary to determine whether the differences observed *in vitro* are maintained *in vivo*.

Acknowledgments

This research was partially supported by the Agencia

Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Universidad de la República (CAPES-Udelar) and Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE-HCPA), Brazil.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. An SY, Han J, Lim HJ, Park SY, Kim JH, Do BR, Kim JH. Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2014, **46**, 127-135.
2. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 2013, **62**, 1131-1141.
3. Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One* 2012, **7**, e36569.
4. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2009, **23**, 3494-3505.
5. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013, **15**, 641-648.
6. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991, **9**, 641-650.
7. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003, **73**, 778-786.
8. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001, **189**, 54-63.
9. Guercio A, Di Bella S, Casella S, Di Marco P, Russo C, Piccione G. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int* 2013, **37**, 789-798.
10. Hocking SL, Chisholm DJ, James DE. Studies of regional adipose transplantation reveal a unique and beneficial interaction between subcutaneous adipose tissue and the intra-abdominal compartment. *Diabetologia* 2008, **51**, 900-902.
11. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Woo HM, Kim WH, Kweon OK. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci* 2012, **13**, 299-310.
12. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005, **23**, 412-423.
13. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, Matthay MA. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells* 2010, **28**, 2229-2238.
14. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 2006, **12**, 2093-2104.
15. Lee KS, Kang HW, Lee HT, Kim HJ, Kim CL, Song JY, Lee KW, Cha SH. Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci* 2014, **96**, 267-275.
16. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaioles M, Mascarello F, Decaminada M, Patruno M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci* 2011, **91**, 18-24.
17. Mitchell A, Rivas KA, Smith R 3rd, Watts AE. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5%. *Stem Cell Res Ther* 2015, **6**, 231.
18. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonik S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006, **24**, 376-385.
19. Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater* 2010, **6**, 900-908.
20. Nijnik A, Hancock RE. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol* 2009, **16**, 41-47.
21. Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg* 2006, **117**, 1462-1470.
22. Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem

- cells. *Stem Cell Rev* 2012, **8**, 1211-1222.
23. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 2009, **5**, 378-386.
24. Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC 3rd, Borjesson DL, Zhu M. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol* 2014, **161**, 21-31.
25. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005, **54**, 132-141.
26. Szaraz P, Librach M, Maghen L, Iqbal F, Barretto TA, Kenigsberg S, Gauthier-Fisher A, Librach CL. In vitro differentiation of first trimester human umbilical cord perivascular cells into contracting cardiomyocyte-like cells. *Stem Cells Int* 2016, **2016**, 7513252.
27. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 2012, **8**, 150.
28. Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, Laurino C, Passos E, Paz AH, Cime-Lima E. Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells Int* 2014, **2014**, 720753.
29. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 2008, **7**, 410-420.
30. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 2010, **19**, 279-289.
31. Volk SW, Theoret C. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen* 2013, **21**, 382-394.
32. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2006, **2**, 155-162.
33. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007, **25**, 2648-2659.
34. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Rial A, Muñoz N, Moreno M, Erickson K, Maisonnave J. Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Vet Med Res Rep* 2013, **4**, 39-44.
35. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001, **7**, 211-228.

6.4 *Manuscrito III*

Use of platelet lysate with basal concentration as supplement culture media in equine mesenchymal stromal/stem cells

Yaneselli, Kevin; Valeria, Campbell; Fernández, Sofia; Ríos, Mauro; Mirazo, Javier; Llambí, Silvia; Algorta, Agustina; Vila, Fernando; Maisonnave, Jacqueline.

(Para enviar)

Los principales aportes de este trabajo son:

- Se observó que la cinética de crecimiento y multipotencialidad *in vitro* tuvo un comportamiento similar para las AD-MSCs cuando fueron cultivadas con el nuevo suplemento compuesto por PL alogénico con concentración de plaquetas basal (BPL) y la condición estándar suplementada con FBS.

Use of platelet lysate with basal concentration as supplement culture media in equine mesenchymal stromal/stem cells

Yaneselli, Kevin¹; Valeria, Campbell²; Fernández, Sofía¹; Ríos, Mauro¹; Mirazo, Javier²; Llambí, Silvia³; Algorta, Agustina¹; Vila, Fernando⁴; Maisonnave, Jaqueline¹.

¹Área Inmunología, Facultad de Veterinaria, Udelar; ²Departamento Equinos, Facultad de Veterinaria, Udelar; ³Área Genética, Facultad de Veterinaria, Udelar; ⁴Área Bioestadística, Facultad de Veterinaria, Udelar

Abstract

Fetal Bovine Serum (FBS) is a common supplement for *ex vivo* propagation of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs), but it carries several drawbacks, such as safety problems with transplant of xenogenic proteins and pathogens as well as ethical problems during the FBS extraction. Our objective was to evaluate the substitution of FBS by equine platelet lysate (PL) in equine MSCs culture. The adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs) were isolated from adipose tissue of four healthy adult horses. The platelet lysate (PL) for supplement was obtained from 3 healthy adult horses. The AD-MSCs cultures were supplemented with 20% of pooled allogeneic PL (three donors), basal PL (BPL) had a concentration of 96×10^3 platelets/ μL and 10% FBS supplementation as control. The AD-MSCs were characterized by *in vitro* differentiation and colony-forming unit-fibroblastic (CFU-F) assay. The proliferation was evaluated by calculating the cell doubling time (DT) between 2–6 passage. Both culture media with FBS or BPL supplement, formed fibroblastic colonies and were positive to chondrogenic and osteogenic differentiation. Regarding proliferation ability, the DTs obtained during successive passages showed similar behaviour for both supplements. In conclusion, allogeneic BPL can be used as a supplement for equine AD-MSCs expansion, without affecting their *in vitro* proliferation and plasticity.

Keywords: Mesenchymal stromal/stem cells, platelet lysate, xeno-free media.

1. Introduction

The mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) are known in equine medicine for their use in musculoskeletal, joint and tendinous diseases (Broeckx et al., 2014; Carvalho et al., 2016). When used in equine medicine, the dose of MSCs is at least 10×10^6 cells, to reach that amount of cells is necessary *ex vivo* propagation (Williams et al., 2016; Barrachina et al., 2018). For this purpose, cells are cultivated in culture media supplemented with fetal bovine serum (FBS), which is considered the gold standard supplement to promote *in vitro* growth of mammal cells. Furthermore, its use in culture carries several ethical and safety problems. From an ethical point of view, FBS is obtained by intracardiac puncture of fetus until complete bleeding and death. This method of extraction causes fetal suffering (Bieback et al., 2009; Hemeda et al., 2014). Regarding safety, it has been described that hosts of cell therapy developed a xeno-response to different compounds of FBS that are vehicle with cells (Spees et al., 2004; Iudicone et al., 2014). Recent studies showed a more intense adverse reaction when intraarticularly injected cells were cultured with FBS compared to homologous platelet lysate (PL) (Joswig et al., 2017). Due to these drawbacks, replacement of the classic supplement FBS with PL, in equine MSC's characteristics is similar in cell kinetics growth, multidifferentiation and immunomodulatory capacity (Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Naskou et al., 2018), making possible to avoid xeno-contamination and adverse reactions caused by FBS. However, described protocols for obtaining concentrated PL (CPL) or better known as platelet enriched plasma (PRP), are of very low performance because reaching high platelet concentrations need concentrating total obtained plasma volume at least 10–25% (Argüelles et al., 2006). This means extracting large volumes of blood for large scale propagation of MSCs. The objective of the present study was to evaluate the substitution of FBS for allogeneic PL at a basal platelet concentration (BPL) in *ex vivo* propagation of equine adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs).

2. Materials and methods

2.1 PL preparation

Peripheral blood samples were obtained from jugular vein of 3 healthy adult equines, non defined breed. Syringes with sodium citrate 3.8% (w/v) relation 1:10 of blood. The sample was transported at 4–8°C and then centrifuged as 230 g for 10 min to separate plasma. An aliquot of 1 ml was obtained for platelet count from each donor and the remaining plasma was stored as –20°C. Once stored, the plasma was thawed at 37°C for 20 min in a water bath. Finally, a centrifugation at 1600 g for 30 min at 10°C was made to remove platelet debris. The supernatant was pre-filtered with 0.80 µm and 0.22 µm filters. Storage of BPL was made at -20°C. Sample extraction proceedings counted with authorization of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-FVET number 300).

2.2 MSCs isolation

Isolation protocol was adapted from standard AD-MSCs previously described (Yaneselli et al., 2013). Briefly, samples of adipose tissue from the base of the tail was taken from healthy adult equines ($n = 4$) *post-mortem* from slaughterhouse. Adipose tissue was cut in small pieces and enzymatic digestion was made with 1 mg/kg type I collagenase for 20–40 minutes and then seeded in 6 wells plates. AD-

MSCs were cultured to passage 2 (P₂) and cryopreserved. Culturing media consisted of Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Gibco, EE.UU), 10% SFB (Probiomont S. A., Uruguay) and 2% penicillin - streptomycin (Gibco, EE.UU). Cryopreservation was made by suspending cells in a solution of 95% of FBS and 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Applichem, Germany) and was stored at -80°C.

2.3 Evaluation of Cellular proliferation with BPL

To evaluate cellular growth kinetics, cellular doubling time (DT) were determined according to two formulae: 1) $CD = \ln(N_f/N_i)/\ln(2)$ and 2) $DT = CT/CD$, where CD = cell doubling number; N_f = final number of cells; N_i = initial number of cells; and CT = days of culture (Vidal et al., 2007). AD-MSCs P₂ were thawed and cultured until P₆ with 2 culture conditions: FBS (culture media supplemented with 10% FBS) and BPL (culture media supplemented with 20% BPL and 2 UI heparin/mL to avoid gelification).

2.4 MSCs characterization

Colony forming units-fibroblast (CFU-F): equine AD-MSCs at P₂ were seeded at 150 cells/cm² changing media every 3–4 days during 14 days. Cells were fixed with methanol at -20°C and dyed with Giemsa to observe the fibroblastic colony formation. The assay was performed with cells under FBS and BPL conditions, adapted from protocol previously described (Seo et al., 2013).

Tridiferetation in vitro: equine AD-MSCs P₃ were seeded at 9.4×10^3 /well 24 wells plates. After 24 hours of culture, inductor media were added for adipose and chondrogenic lineage (Yaneselli, 2015) and osteogenic lineage (Seo et al., 2013) with FBS or BPL as a supplement. Media was changed every 3–4 days. After 21 days, cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution and dyed with Oil Red O, Alcian Blue and Alizarin red (Sigma, EE.UU.), respectively for each lineage (Yaneselli, 2015).

2.5 Statistical analysis

The DT behaviour for each passage and culture condition was analysed by t Student test, $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results and discussion

PL preparation was made with a pooled plasma at basal concentration 96×10^3 platelets/ μ L, which is lower than the concentration described in previous reports, such as 1000×10^3 platelets/ μ L called CPL (Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Naskou et al., 2018). To obtain this high concentration, it is necessary to use a double centrifugation protocol, unlike ours, which requires single centrifugation that involves less manipulation of the blood samples. Several studies showed a higher proliferation rate of AD-MSCs when cultured with PL instead of FBS (Lohmann et al., 2012; Naaijken et al., 2012). This could indicate that the concentration of PL provides a stronger stimulus than FBS due to higher concentration of platelet growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF) which is present in platelets alpha granules (Russell and Koch, 2016). There are several protocols described (Burnouf et al., 2016) so we believe that it is necessary to continue studying the composition of the new supplement and platelets best concentration to use.

We studied the growth kinetics in several passages by DT assay and we observed that FBS condition showed a range of 1.9–3.2 days and 1.8–2.8 days for BPL (Fig.

1). We observed a grate variation in DT between passages for each condition, furthermore for BPL we observed a lower DT only P₂ and P₄. On the other hand, other passages showed a lower DT for cell cultured with BPL, but there were no significant differences. However, studies of equine bone marrow MSCs (Naskou et al., 2018; Seo et al., 2013) and umbilical cord blood (Russell and Koch, 2016) did not find differences between cell growth with PL and FBS. Furthermore, there are reports on AD-MSCs showing a higher proliferation capacity with CPL than FBS for humans (Cholewa et al., 2011; Lohmann et al., 2012), but there are no reports comparairng kinetic proliferation of PL vs FBS on equine AD-MSCs.

In the present study, we were able to culture AD-MSCs through several passages (P₂–P₆) with both supplements (BPL and FBS) and they showed plastic adhesion and a fibroblastic-like morphology, but for BPL condition, cells where smaller (F2, A and B). This observation agrees with Naaijkens et al. (2012) who observed a reduction of 25% in size of human AD-MSC cultured with PL, agreeing with Seo et al. (2013) described smaller cell morphology for equine bone marrow MSCs cultured with PL. On the other hand, other studies did not mention morphology changes for equine MSCs of different sources (Del Bue et al., 2007; Russell and Koch, 2016; Naskou et al., 2018). We demonstrated that AD-MSCs had CFU-F capacity with both conditions (Fig 2, G and H) and capacity to differentiate to osteogenic and chondrogenic lineage (Fig 2, C–F). However, we did not obtain an adipose differentiation, neither for standard condition nor for BPL, disagreeing with other authors that did obtained this differentiation (Del Bue et al., 2007; Naskou et al., 2018). A possible explanation could be that the protocol we used was originally described for canine AD-MSCs (Yaneselli et al., 2015). We could have possibly obtained adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation, using other described inductor media. However, most reports that evaluated PL for equine MSCs did not obtain a complete tridifferentiation (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016) except in a recent work (Naskou et al., 2018). In summary, the allogeneic BPL can be used as supplement for *ex vivo* propagation of AD-MSCs with a similar growth kinetic as standard conditions with FBS. Cells cultured with BPL showed CFU-F capacity, osteogenic and chondrogenic differentiation *in vitro*. It is necessary to continue studying the PL composition and the optimal platelet concentration, to be used as a supplement for MSCs.

4. Reference

- Argüelles, D., Carmona, J.U., Pastor, J., Iborra, A., Viñals, L., Martínez, P., Bach, E., Prades, M., 2006. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res. Vet. Sci.* 81, 237–245.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Roca, M., Zaragoza, P., Vázquez, F.J., Rodellar, C., 2018. Assessment of effectiveness and safety of repeat administration of proinflammatory primed allogeneic mesenchymal stem cells in an equine model of chemically induced osteoarthritis. *BMC Vet. Res.* 14, 241.
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., Klüter, H., 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27, 2331–2341.
- Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Mariën, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregón, A., Wuertz, K., Spaas, J.H., 2014. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One* 9, e85917.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B.C., Schallmoser, K., 2016. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387.
- Carvalho, A.D.M., De Mattos Carvalho, A., Hussni, C.A., Alves, A.L.G., 2016. Adipose tissue as mesenchymal stem cells source in equine tendinitis treatment. *Semina: Ciências Agrárias*. 31, 6.
- Cholewa, D., Stiehl, T., Schellenberg, A., Bokermann, G., Joussen, S., Koch, C., Walenda, T., Pallua,

- N., Marciniak-Czochra, A., Suschek, C.V., Wagner, W., 2011. Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 20, 1409–1422.
- Del Bue, M., Riccò, S., Conti, V., Merli, E., Ramoni, R., Grolli, S., 2007. Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet. Res. Commun.* 31, 289–292.
- Hemeda, H., Giebel, B., Wagner, W., 2014. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16, 170–180.
- Iudicone, P., Fioravanti, D., Bonanno, G., Miceli, M., Lavorino, C., Totta, P., Frati, L., Nuti, M., Pierelli, L., 2014. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* 12, 28.
- Joswig, A.-J., Mitchell, A., Cummings, K.J., Levine, G.J., Gregory, C.A., Smith, R., 3rd, Watts, A.E., 2017. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 42.
- Lohmann, M., Walenda, G., Hemeda, H., Jousen, S., Drescher, W., Jockenhoevel, S., Hutschenreuter, G., Zenke, M., Wagner, W., 2012. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 7, e37839.
- Naaijken, B.A., Niessen, H.W.M., Prins, H.-J., Krijnen, P.A.J., Kokhuis, T.J.A., de Jong, N., van Hinsbergh, V.W.M., Kamp, O., Helder, M.N., Musters, R.J.P., van Dijk, A., Juffermans, L.J.M., 2012. Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell Tissue Res.* 348, 119–130.
- Naskou, M.C., Sumner, S.M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., Galipeau, J., Peroni, J.F., 2018. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 75.
- Russell, K.A., Koch, T.G., 2016. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet. J.* 48, 261–264.
- Seo, J.-P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N., 2013. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 95, 693–698.
- Spees, J.L., Gregory, C.A., Singh, H., Tucker, H.A., Peister, A., Lynch, P.J., Hsu, S.-C., Smith, J., Prockop, D.J., 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 9, 747–756.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.* 36, 613–622.
- Williams, L.B., Koenig, J.B., Black, B., Gibson, T.W.G., Sharif, S., Koch, T.G., 2016. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. *Equine Veterinary Journal.* 48, 619–625.
- Yaneselli, K.M. (2015). Caracterización de las Células Madre Mesenquimales Caninas derivadas de tejido adiposo/CMM-TA) extraídas de dos sitios anatómicos diferentes. Tesis de Maestría en Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.
- Yaneselli, K.M., Filomeno, A., Semiglia, G., Arce, C., Rial, A., Muñoz, N., Moreno, M., Erickson, K., Maisonnave, J., 2013. Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Veterinary Medicine Research & Report* 4 39–44

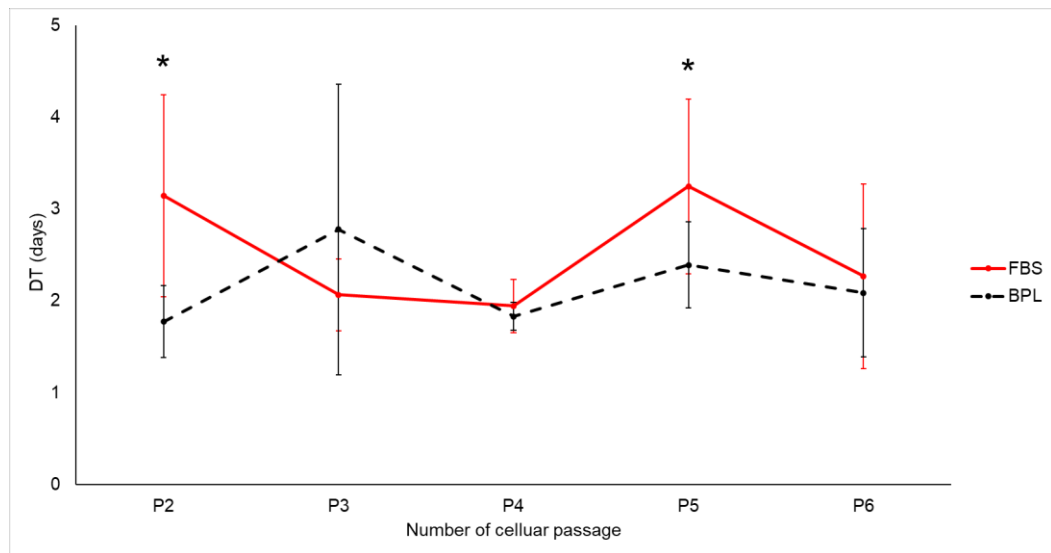


Fig. 1. Graph of cell doubling times (DT) of adipose-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSCs) cultured ($n = 4$) for each passage under both different culture conditions. The results are expressed as mean $\pm$ SD for each condition and each passage. * = mean significance $p < 0.05$.

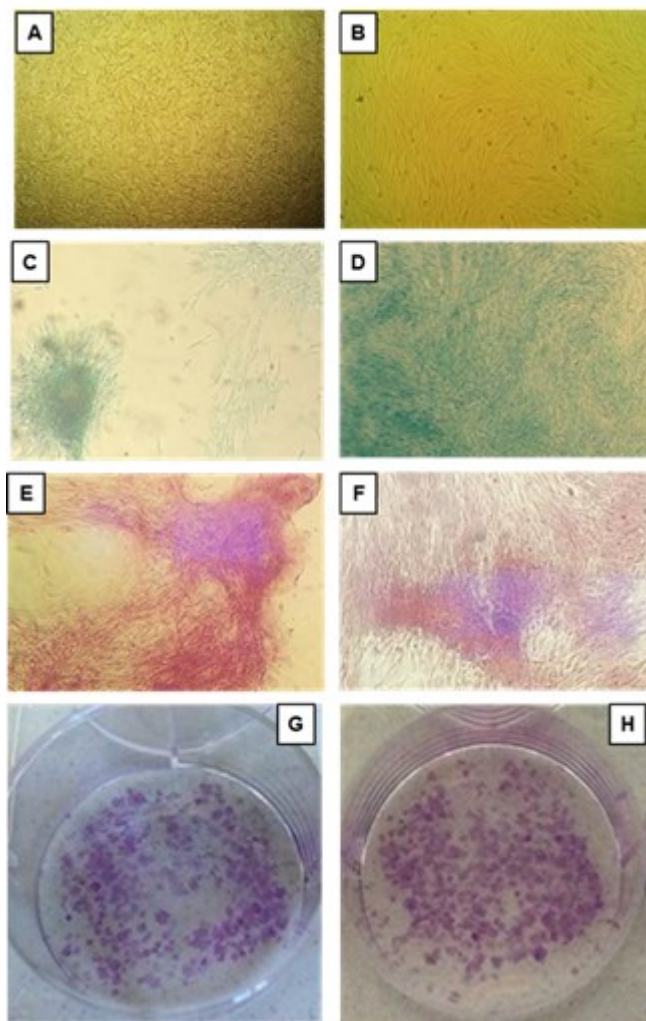
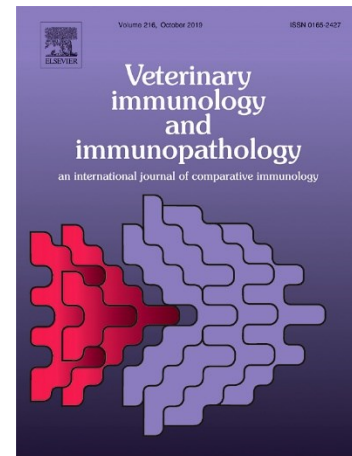


Fig 2. Characterization of adipose-derived mesenchymal stroma cells (AD-MSCs) cultured with basal platelet lysate (BPL) and fetal bovine serum (FBS). Microscopic image of AD-MSCs 4x magnified for BPL (A) and FBS (B). Chondrogenic (C and D) and osteogenic lineage differentiation (E and F) 4x magnified. Macroscopic image of colony forming units-fibroblast (CFU-F) for both conditions (G and H).

6.5 Manuscrito IV



Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile

Kevin Yaneselli, Laura Barrachina, Ana Rosa Remacha, Agustina Algorta, Arantza Vitoria, Alina Cequier, Antonio Romero, Francisco José Vázquez, Jacqueline Maisonnave, Clementina Rodellar.

Vet Immunol Immunopathol. 2019 Sep 21;217:109944.
doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109944.

Los principales aportes de este trabajo son:

- Se consiguió reemplazar el FBS para la propagación *ex vivo* y criopreservación de las BM-MSCs equinas con diferentes formulaciones de lisado plaquetario alogénico.
- Se determinó por primera vez el perfil génico de aspectos inmunogénicos e inmunomoduladores de las BM-MSCs equinas cultivadas con diferentes formulaciones de lisado plaquetario alogénico.
- Se observó que las células cultivadas con lisado plaquetario alogénico concentrado como suplemento presenta un perfil similar al que adquieren las MSCs equinas en un contexto proinflamatorio *in vitro*.

Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile

Kevin Yaneselli^a, Laura Barrachina^b, Ana Rosa Remacha^b, Agustina Algorta^a, Arantza Vitoria^{b,c}, Alina Cequier^b, Antonio Romero^{b,c}, Francisco José Vázquez^{b,c}, Jacqueline Maisonnave^a, Clementina Rodellar^b.

^aÁrea Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 11600, Montevideo, Uruguay

^bLaboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO), Instituto Agroalimentario de Aragón IA2 - Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón IIS, Universidad de Zaragoza, 50013, Zaragoza, Spain.

^cServicio de Cirugía y Medicina Equina, Hospital Veterinario, Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain

Abstract

Propagation *ex vivo* of mesenchymal stem cells (MSCs) requires culture medium supplementation. Fetal bovine serum (FBS) has long been the gold standard supplement, but its use is being questioned mainly due to ethical and safety issues. The use of platelet lysate (PL) as substitute of FBS has been proposed but little is known about its effects on equine MSCs characteristics including their immune profile. The aim of this work was to investigate for the first time the effect of allogeneic PL on the immunogenic and immunomodulatory gene expression profile of equine bone marrow derived MSCs (eBM-MSCs) as well as on their proliferation ability, phenotype markers, and viability post-cryopreservation. The eBM-MSCs (n = 3) cultures were supplemented with 20% of allogeneic pooled concentrated PL (CPL; 591×10^3 platelets/ μ L) or basal PL (BPL; 177×10^3 platelets/ μ L) from three donors, using 10% FBS supplementation as control. The proliferative ability of eBM-MSCs under the three conditions was evaluated by calculating the cell doubling times (DT) up to passage 3 (P3) and by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay at P3. Viability of eBM-MSCs post-cryopreserved with CPL or FBS was assessed at 15, 30 and 60 days. The gene expression profile of eBM-MSCs was evaluated in P₃ by RT-qPCR for characterization, immunogenic and immunomodulatory markers. The cells cultured in CPL had significantly higher ability to proliferate than with FBS or BPL ($P < 0.001$) in the MTT assay. Post-cryopreserved viability was similar between cells cultured and preserved in FBS and CPL at all timepoints. Gene expression of MSC characterization markers was similar among the three conditions. The gene expression of the immunogenic markers MHC-I, MHC-II and CD40 was slightly (non-significant) increased in CPL condition compared to FBS and BPL. The CPL condition showed higher expression of the genes coding for the immunomodulatory molecules VCAM-1 (non-significant) and IL-6 ($P < 0.05$), and similar for COX-2; whereas iNOS and IDO were not expressed under any condition. In conclusion, the replacement of FBS by allogeneic CPL as a supplement for *ex vivo* propagation of eBM-MSCs provides appropriate proliferation and cryopreservation, and mildly upregulates the gene expression of immunomodulatory markers, thus constituting a potentially suitable alternative to the use of FBS. Further studies are needed to clarify the composition and effects of CPL supplementation on equine MSCs immunological profile.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have generated a great interest because of their therapeutic potential, primarily due to their ability to promote tissue healing mainly through their regulatory and immunomodulatory properties (Berglund et al., 2017; Cassano et al., 2018b). In the horse, cell therapy has been mainly investigated to treat orthopedic pathologies, mostly tendons and joints (de Mattos Carvalho et al., 2011; Broeckx et al., 2014). Therapy with MSCs requires *in vitro* cell expansion prior to its application to obtain a more homogeneous population and reach an appropriate cell number for the treatment. Fetal bovine serum (FBS) is usually considered as the gold standard supplement for MSC culture of different species (Bieback et al., 2009; Iudicone et al., 2014). Besides, FBS is also used as a cryoprotective agent in combination with 5–10% dimethyl sulfoxide (DMSO) for MSC banking of different species, since it provides growth factors, stabilizes the cell membrane, prevents excessive concentration of solutes, minimizes cell dehydration and reduces the formation of extracellular ice (De Rosa et al., 2009; Wang et al., 2017). Despite its advantages, the use of FBS is being questioned mainly due to ethical and safety issues. From an ethical point of view, the FBS is obtained by intracardiac puncture of the fetus after the pregnant female slaughter (Jochems et al., 2002; Seo et al., 2013), this procedure requires more than one million fetuses per year (Jochems et al., 2002; Hemeda et al., 2014). Concerning safety, there is a risk of a xeno-response as cultured cells are in contact with proteins from bovine species, plus it exists risk for prion transmission (Spees et al., 2004; Doucet et al., 2005; Chou et al., 2015).

Regarding immune xeno-response, some studies found increased anti-FBS antibody titers after receiving cell therapy in rat (Spees et al., 2004) and human, even though with low frequency (Horwitz et al., 2002). In the horse, the only study evaluating anti-FBS antibodies after MSC therapy did not find a significant titer increase, but pre-existing anti-FBS antibodies were found, likely induced by xeno-contamination of viral vaccines (Owens et al., 2016). Nevertheless Joswing et al. (2017) showed inflammatory joint reaction due to the use of FBS-contaminated MSCs, indicating the relevance of developing new strategies to reduce or delete FBS xeno-antigens. The FBS proteins are internalized by the cells so repeated washing is inefficient to completely remove the xeno-contamination, but it is possible to reduce it drastically when cells are cultured with homologous serum or platelet lysate (PL) for a short period of time (Spees et al., 2004; Joswig et al., 2017).

Due to the disadvantages of FBS as culture supplement and the need of cryobanking MSCs for therapeutic application, there are recent studies evaluating alternatives to replace the FBS, such as PL (Wang et al., 2017). Nowadays, the PL has gained interest since it allows xeno-free media and avoids the problems associated with the classic FBS supplementation. In addition, PL can be produced allogeneically, rather inexpensively and on large-scale in humans (Iudicone et al., 2014) and equines (Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016). In humans, several studies demonstrate that PL can replace the FBS to grow MSCs while preserving their characteristics *in vitro*, such as proliferation, multipotency and immunomodulation (Doucet et al., 2005; Iudicone et al., 2014). In equines, the effect of PL on the proliferative capacity and differentiation ability of the MSCs has been studied showing a behavior similar to the standard FBS supplementation (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016). However, equine MSC immune properties have been barely investigated under this condition. One recent study evaluated the capacity of equine MSCs cultured with allogeneic PL for regulating proinflammatory cytokine synthesis by monocytes under

proinflammatory stimulation in an in vitro coculture system, finding a suppressive capacity similar to FBS-cultured MSCs (Naskou et al., 2018). However, the immunogenic and immunomodulatory profiles of MSCs were not evaluated. Thus, we aimed to investigate for the first time the effect of allogenic PL on the gene expression profile of immunogenic and immunomodulatory markers in equine bone marrow derived MSCs (eBM-MSCs), as well as on their proliferation ability, phenotype markers, and post-cryopreservation viability.

Materials and methods

Study Design

Equine bone marrow derived MSCs (eBM-MSCs) from three donors, cryopreserved at passage 1 (P₁), were thawed and subcultured up to P₃ with different culture media supplementation: (a) FBS: 10% FBS; (b) CPL: 20% allogeneic concentrated platelet lysate (CPL) and (c) BPL: 20% allogeneic basal platelet lysate (BPL). First, proliferative capacity was evaluated from P₁ to P₃ by calculating cell doubling times (DT) and at P₃ by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Second, we evaluated for the three culture conditions at P₃ the expression profile of genes coding for phenotype characterization surface molecules, immunogenic antigens and molecules related to the immunomodulatory ability by using real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Third, eBM-MSCs P₃ were cryopreserved with 90% FBS or CPL and 10% DMSO to evaluate post-cryopreservation cell viability at 15, 30 and 60 days.

Animals

Three healthy horses (400–450 kg weight, age 15–20 years, two crossbred female and one crossbred gelding) were used for the extraction of whole blood to produce the PL pool. Biological samples were obtained according to local animal welfare regulations. All procedures were carried out under Project Licence PI 31/11 approved by the inhouse Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The eBM-MSCs P₁ (n =3) used for this assay came from the MSC bank of LAGENBIO, so no animals were used in this study for BM harvesting. This was decided to avoid the harvesting of bone marrow with the solely purpose of this study, as well as because it has been reported that 48 h of FBS deprivation are enough to drastically reduce the internalization of FBS proteins in equine MSCs (Joswig et al., 2017) and this study aimed at culturing cells for several weeks. The eBM-MSCs were previously isolated from three healthy client-owned horses (450–500 kg weight, age 3–6 years, two Thoroughbred geldings and one Spanish purebred gelding) under previous owner consent and agreement to use the cells for scientific purposes. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Allogeneic pooled PL preparation

Whole blood was aseptically collected from the jugular vein of the three donor animals using 3.8% sodium citrate (Fluka) as anticoagulant. Once the blood was extracted between a range of 1680–2280 ml/horse, syringes were placed vertically for 30 min in order to obtain plasma separation. For the extraction of PL with basal concentration of platelets (BPL), the plasma was centrifuged only once at 200g for 10 min to remove red and white blood cells and the supernatant was collected. To obtain PL with higher

platelet concentration (CPL), a second centrifugation was carried out. The plasma supernatant collected after first centrifugation was then centrifuged at 1500g for 20 min to pellet the platelets. The supernatant (platelet-poor plasma) was removed and used to resuspend the pellet in a 10% of the original volume (Gilbertie et al., 2018). A sample from each animal and each preparation (basal or concentrated), separately and pooled, was taken to perform platelet and white blood cell (WBC) count using a flow cytometry hematology system (Laser-Cyte Dx, IDEXX Laboratories). Finally, both basal and concentrated platelet solutions pooled from the three donors were stored at -80°C overnight and quickly thawed at 37°C in a water bath to lysate the platelets (Russell and Koch, 2016). Subsequently, to remove platelet debris, pooled BPL and CPL were centrifuged at 1600g for 30 min and the supernatant was filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ vacuum filter.

Culture of eBM-MSCs

The eBM-MSCs used in this study were initially isolated by BM density-gradient centrifugation as previously described (Remacha et al., 2015) and cultured in standard culture medium, consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose, 2mM L-glutamine, 0.1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 10% FBS (all from Sigma-Aldrich) until passage 1 (P_1). When these cells were cultured to use with a different purpose, part of them were cryopreserved in 90% FBS and 10% DMSO at -80°C . For the current study, the cryopreserved cells at P_1 were thawed and plated at 5×10^3 cells/cm² and subsequently cultured up to P_3 , under the three different conditions: (a) FBS: standard culture medium supplemented with 10% FBS (standard condition); (b) CPL: standard culture medium supplemented with 20% allogeneic pooled CPL (instead of FBS) and (c) BPL: standard culture medium supplemented with 20% allogeneic pooled BPL (instead of FBS). The PL concentration in media was chosen based on previous reports (Russell and Koch, 2016) and preliminary assays of our group (unpublished data). Heparin (2 IU/mL) was added as anticoagulant to prevent clotting to all media conditions (Seo et al., 2013). Culture media were changed twice a week and cells were subcultured until P_3 when approximately reached 80% confluence by treating with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich).

Cell proliferation evaluation

At each passage when cells were detached and counted, cell doubling times (DT) were determined according to two formulae: 1) $CD = \ln(N_f/N_i)/\ln(2)$ and 2) $DT = CT/CD$, where CD = cell doubling number; N_f = final number of cells; N_i = initial number of cells; and CT = days of culture. At P_3 , the proliferative ability of eBM-MSCs cultured under the three conditions was determined by MTT assay during 7 days as previously described (Ranera et al., 2012). Briefly, 9 technical replicates of each sample were seeded in 96-well plates with each media at 1600 cells/well (5×10^3 cells/cm²). Culture media alone (no cells) was used as a blank in each plate. The spectrophotometer (Biotek Synergy HT) was used to measure the optical density (570 nm) in each well. Viable cell numbers were determined by extrapolating from a standard curve consisting of 10 points (6 technical replicates per point) with increasing quantity of cells (0–60,000 cells/well). The total number of viable cells was determined by extrapolation from a calibration curve for each culture condition: FBS $y = 1 \times 10^{-5}x + 0.0859, r^2 = 0.948$; CPL $y = 5 \times 10^{-6}x + 0.0309, r^2 = 0.989$; BPL $y = 1 \times 10^{-5}x + 0.0124, r^2 = 0.990$ (y = optical density of the well; x = amount of cells).

Cell viability post-cryopreservation

The eBM-MSCs P₃ were cryopreserved with 90% of FBS or CPL and 10% DMSO in 1 ml total volume and were stored at -80 °C. Cell viability was evaluated immediately after thawing at three different times: 15, 30 and 60 days post-cryopreservation. Cells were counted in a hemocytometer chamber using 0.4% Trypan Blue as vital stain.

RNA isolation from eBM-MSCs

Total RNA was extracted from 1×10⁶ eBM-MSC P₃ cultured under the three conditions (FBS, CPL and BPL) with the commercial kit RNeasy Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions and DNase Turbo (Ambion) was used to remove genomic DNA according to manufacturer's instructions. Subsequently, 1 µg mRNA was retrotranscribed into complementary DNA (cDNA) using the Superscript Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

Gene expression analysis of eBM-MSCs by RT-qPCR

The gene expression of the eBM-MSCs cultured in the three conditions was assessed at P₃ for different markers: (a) genes coding for phenotype characterization surface molecules: Cluster of Differentiation (CD) 44, CD73, CD90, CD105, CD34 and CD45; (b) genes coding for the antigen presenting-related molecules: Major Histocompatibility Complex type I (MHC-I) and type II (MHC-II) and the costimulatory molecule CD40; (c) genes coding for molecules related with the immunomodulatory ability of MSCs: cyclooxygenase 2 (COX-2), interleukin 6 (IL-6), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO). The genes beta2-microglobulin (B2M) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used as housekeeping. Primer details, accession numbers for mRNA sequences and amplicon sizes are shown in Table 1 and have been previously validated and used in other studies, as well as the RT-qPCR methodology (Barrachina et al., 2016, 2017). Briefly, RT-qPCR was performed and monitored using the StepOne RealTime PCR System device (Applied Biosystems). All reactions were carried out in triplicate in a total volume of 10 µL with 2 µL of cDNA as a template and Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The cDNA was amplified following the manufacturer's protocol: 20" at 95 °C for initial activation and denaturation, followed by 40 cycles consisting of 3" at 95 °C and 30" at 60 °C. A dissociation curve protocol was run after all PCR reactions. The levels of gene expression were determined by the comparative $\Delta\Delta C_t$ method. A normalization factor (NF) was calculated as the geometric mean of the quantity of two housekeeping genes and gene expression in FBS condition (control) was used as reference to calculate fold changes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Prism Inc.). Data proliferation from the MTT assay was analyzed by the nonparametric ANOVA Kruskal-Wallis test with Dunn's *post-hoc* test to assess differences between conditions (FBS, CPL and BPL) at each time-point and study differences along time (day 1 to 7) within each condition. The paired Friedman test followed by the posthoc Dunn's test was used to compare the DTs from each condition along passages and among conditions at each passage, as well as for studying differences in post-cryopreservation viability along the different timepoints. Post-cryopreservation viability data from FBS and CPL conditions was compared with Wilcoxon paired test at each

time-point. The expression of each gene was compared between different conditions (FBS, CPL and BPL) by using the paired Friedman test followed by the *post-hoc* Dunn's test. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Significance was set at $P < 0.05$ for all analysis.

Results

Characteristics of the allogeneic PL

The CPL presented a concentration of 591×10^3 platelets/ μ L and 590 WBC/ μ L, whereas the BPL consisted of 177×10^3 platelets/ μ L and 130 WBC/ μ L. The ratio platelet:WBC was 1002:1 for CPL and 1361:1 for BPL. Furthermore, the efficiency of obtaining CPL was 5.3% and BPL 40% of the blood volume extracted

Morphological characteristics and proliferation ability of eBM-MSCs cultured with PL

The eBM-MCs showed fibroblast-like spindle shape under the three culture conditions (Fig. 1). Regarding proliferation ability, the DTs obtained during successive passages P₁–P₃ were overall lower (faster proliferation) for CPL cultured cells compared to standard condition (FBS) and BPL (Table 2). Significantly shorter DT was observed in P₃ when comparing CPL vs BPL (1.7 ± 0.1 vs 3.9 ± 0.6 days, respectively). Proliferation of eBM-MSCs on P₃ was quantified along one week by MTT assay, showing that CPL condition produced a significantly higher amount of cells from day 5 to 7 when compared to FBS ($P < 0.001$) and from day 4 to 7 compared to BPL ($P < 0.001$) (Fig. 2).

Viability of eBM-MSCs post-cryopreservation with CPL

The percentage of viable eBM-MSCs observed post-cryopreservation was similar when CPL was used compared to FBS at all the time-points analyzed. Furthermore, significant differences were not observed among different time-points within any condition (Table 3). The supplement BPL was not assessed for cryopreservation because of the low amount of cells obtained under this culture condition, which was insufficient to perform all the assays. Therefore, we decided to prioritize the assessment of proliferation and gene expression.

Gene expression profile phenotype characterization markers

The gene expression of surface markers generally used for eBMMSCs characterization was assessed at P₃. In the three culture conditions, the cells presented similar expression of positive markers CD44, CD73, CD90 and CD105, and did not show gene expression of negative markers CD34 and CD45. Thus, the culture under both CPL and BPL supplements did not seem to change the gene expression of phenotype characteristic markers (Fig. 3 A).

Gene expression of immunogenic and immunomodulatory profile markers

The eBM-MSCs P₃ cultured with CPL showed slightly increased (non-significant) gene expression of the immunogenic markers MHC-I, MHC-II and CD40 compared to control (FBS), whereas the cells cultured with BPL showed expression of these markers similar to control (FBS) cells (Fig. 3 B). The cells cultured with CPL showed overexpression of genes coding for the immunomodulatory molecules IL-6 ($P < 0.05$ compared to FBS) and VCAM-1 (non-significant), whereas COX-2 expression was similar among the three conditions. Gene expression of iNOS and IDO was not detected under any of the three culture conditions (Fig. 3 C).

Discussion

In this study, three main findings were observed. When analyzing the growth kinetics of eBM-MSCs with different supplements, a higher proliferative capacity was shown when using CPL compared to BPL and FBS by MTT assay, similarly to that previously reported (Horn et al., 2010; Hemeda et al., 2014; Russell and Koch, 2016). Secondly, the use

of CPL for cryopreservation provided cell viability similar to FBS at the three time-points assessed, suggesting that it is a good candidate for reducing the xeno-contamination also during MSC banking and being this study the first evaluating MSC viability post-cryopreservation with PL in the horse. Third, when the gene expression profile was explored, a similar expression of surface markers was observed under the three culture conditions, but when evaluating genes linked to immunogenicity and immunomodulation, some differences could be observed between CPL and traditional supplement (FBS), including significant upregulation of the gene coding for IL-6. The profile of these markers in eBM-MSCs cultured in standard conditions (FBS) was similar to previous reports (Remacha et al., 2015; Barrachina et al., 2016). However, there are no previous reports evaluating the gene expression of phenotype characterization, immunogenic and immunomodulatory profile markers in equine MSCs cultured with allogeneic PL.

In this study, platelets were concentrated 3.3 fold more than the basal concentration, reaching 591×10^3 platelets/ μL for the CPL. Other authors assessing the use of CPL reported even higher concentrations of up to 1000×10^3 platelets/ μL in horse (Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016), dog (Russell et al., 2015) and human (Iudicone et al., 2014). The difference between the amount of platelets that we obtained and previous reports could be explained by different methodologies used to obtain PL. Despite of this fact, this lower platelet concentration was enough to promote MSC proliferation following an easy and economic preparation method. Moreover, there is evidence that not only the amount of platelets is important, but also the concentration of certain growth factors, the percentage of PL that is added to the culture media or the age of the PL donor may affect the cell culture as described in human species (Lohmann et al., 2012).

Cells cultured with CPL provided rather faster expansion capacity than BPL based on the shorter DTs observed along passages and the growing kinetics reflected by the MTT assay, thus indicating that CPL is a superior supplement than BPL for ex vivo propagation of eBM-MSCs. This different potential may be due to the higher concentration of growth factors achieved when concentrating platelets, such as basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF) or transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) (Iudicone et al., 2014; Russell and Koch, 2016). However, this hypothesis was not tested in this work by measuring growth factors. Regarding the percentage of PL added to the culture media, we used a concentration of 20% (V/V) of CPL or BPL according to the concentration ranges previously described for equine MSCs culture (Horn et al., 2010; Russell and Koch, 2016). In addition, and based on previous unpublished data of our group, this concentration allowed the comparison between both supplements since lower percentages of BPL do not promote consistent MSC growth. It has been described that increasing concentrations (up to 20%) of both PL and FBS can increase MSC proliferation (Horn et al., 2010). However, we chose not to increase FBS concentration but to keep it at 10% to allow straight comparison with standard culture condition. This could have influenced the higher

proliferation observed under CPL (20%) compared to FBS (10%) in the MTT assay. Nevertheless, based on our results, we could hypothesize that 10% of CPL might be sufficient to promote eBM-MSC proliferation. In addition, 2 IU/mL heparin were added to avoid clotting of the PL as other reports (Seo et al., 2013; Naskou et al., 2018). The heparin frequently used range is 0.6–2 IU/mL, since lower concentrations do not avoid PL gelification and higher than 2 IU/mL may negatively affect *in vitro* proliferation (Hemeda et al., 2013; Burnouf et al., 2016). Thus, providing that heparin can influence cell proliferation, the same concentration was also added to the FBS media. Cell viability was evaluated post-cryopreservation with equine PL during different times and no differences were found between the use of CPL and FBS, indicating that its replacement would be viable, not only for culture but also for cryopreservation. There is only one recent report of Naskou et al. (2018) which mentions the use of equine PL and DMSO (90% and 10%, respectively) as freezing medium for the cryopreservation of eBM-MSCs. However, it is not mentioned the effect on the viability of cryopreserved cells after cryopreservation. On the other hand, the use of human allogeneic PL has been shown to have similar cryoprotective effect than FBS in terms of cell viability of human MSCs (Wang et al., 2017). Finally, in both human and domestic animals, limited reports exist about the effect of PL as cryopreservant on the properties of MSCs, therefore it seems important to continue studying this subject to develop xeno-free cryopreservation for MSC banking.

When evaluating the expression of genes coding for eBM-MSC phenotype associated-markers (Ranera et al., 2011), it was observed that cells cultured under both PL conditions presented similar expression profile between them and compared to the standard condition. Studies on human MSCs have also shown similar immunophenotype profile between cells cultured with FBS or PL (Horn et al., 2010; Hemeda et al., 2014; Iudicone et al., 2014), but there are only few descriptions of the phenotype of equine MSCs cultured with PL. Recently, Naskou et al. (2018) observed a significantly higher percentage of CD90 and CD45 positive equine MSCs cultured with FBS compared to PL culture. In contrast, we observed similar CD90 expression in cells cultured under the three culture media supplementation and did not find CD45 expression under any condition. These differences could be explained by the use of different techniques for phenotype assessment (surface protein expression vs gene expression). The gene expression of these markers has been previously used by other authors for eBM-MSCs characterization (Remacha et al., 2015; Barrachina et al., 2016). When evaluating gene expression of molecules related to allorecognition such as MHC-I, MHC-II and CD40, we found a slightly increased expression (non-significant) of the three of them under CPL culture compared to the other conditions. Other authors have seen a similar profile in MSCs after receiving a pro-inflammatory stimulus (Barrachina et al., 2016; Berglund et al., 2017).

Furthermore, we evaluated for the first time the expression profile of genes coding for molecules closely related to eBM-MSCs immune properties cultured with allogeneic PL. Provided that RT-qPCR is an acknowledged approach and a well validated technique that has been widely used to study immune properties of equine MSCs because of its feasibility (Ranera et al., 2011; Remacha et al., 2015), we considered relevant to assess how culture with allogeneic PL may influence eBM-MSC gene expression profile of related markers. Cells in CPL condition showed increased gene expression of VCAM-1 (non-significant) and IL-6 (significant) and, as aforementioned, also a slight non-significant increase of immunogenic markers. Non-significant results must be cautiously interpreted, but these findings suggest a similar profile shown by cells cultured under pro-inflammatory conditions, such as cytokines stimulation (Ren et

al., 2010; Barrachina et al., 2016; Berglund et al., 2017; Cassano et al., 2018a), activation of TLR-4 pathway or pro-inflammatory macrophages exposure (Cassano et al., 2018b). Pro-inflammatory *in vitro* stimulation of eBM-MSCs with tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interferon gamma (IFN γ) resulted in an upregulation of MHC-II, IL-6 and VCAM-1 (Barrachina et al., 2016, 2017), similar to our CPL condition profile. On the other hand, these studies also described an upregulation of COX-2, IDO and iNOS, whereas we did not find changes for COX-2 expression among the three conditions and IDO and iNOS expression was not induced. Therefore, the upregulation of these immunogenic and immunomodulatory genes might be related with the pro-inflammatory priming of equine MSCs. We hypothesize that these findings in the immune profile of eBM-MSCs might be due to the presence of certain cytokines from residual leukocytes in the PL. Furthermore, the alphagranules of platelets contain growth factors needed to promote the proliferation of MSCs, but can also carry proinflammatory cytokines such as IL-8 (Burnouf et al., 2016). Therefore, the presence of bioactive molecules in the CPL could explain why the eBM-MSCs cultured with CPL showed an inflammatory stimulation-like profile. On the other hand, iNOS and IDO are not expressed by MSCs in basal conditions but induced by inflammatory stimuli (Ren et al., 2010; Barrachina et al., 2016, 2017; Cassano et al., 2018a). The lack of expression induction of these genes might indicate low inflammatory level of the CPL, not enough to significantly upregulate several immune-related markers. This hypothesis was not tested in the present study as we did not measure in the PL potentially implied mediators, but warrants further investigation to thoroughly assess its composition and how it may influence the properties of equine MSCs. Since MSCs can respond to their environment, the possibility of priming these cells to increase their immunomodulatory potential (Szabó et al., 2015; Barrachina et al., 2017, 2018; Cassano et al., 2018b) could be an additional advantage of the CPL as culture supplement.

Conclusion

The use of allogenic pooled concentrated PL as culture media supplement instead of FBS was suitable for the *ex vivo* propagation of eBM-MSCs during successive passages with similar growth and phenotype characteristics, as well as for cryopreservation. The cells cultured with CPL slightly increased the expression of immunogenic genes and significantly upregulated IL-6 as immunomodulatory marker. This study provides, for the first time, information about the effect of replacement of FBS by PL as cell culture supplement on the immune profile of eBM-MSCs. Further studies are warranted to gain deeper knowledge into the effect of PL on equine MSC immune properties and to develop xeno-free media, provided their key role in the effectiveness and safety of cellular therapies.

Conflict of interest

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of paper.

Acknowledgements

This study was supported mainly by the project AGL2017-84411-P (Ministerio de Industria, Economía y Competitividad, España) (project AGL2017-84411-P) and partially financed by the *Gobierno de Aragón* (Grupo de Investigación A19_17R

LAGENBIO). We acknowledge the mobility program of the *Comisión Sectorial de Investigación Científica* (CSIC) of *Universidad de la República* (Udelar), Uruguay (mobility program), for providing the logistical financing necessary to carry out this work in a binational manner.

References

- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2016. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 171, 57–65.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Gosálvez, J., Roy, R., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2017. Priming equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells with proinflammatory cytokines: implications in immunomodulation-immunogenicity balance, cell viability, and differentiation potential. *Stem Cells Dev.* 26, 15–24.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Roca, M., Zaragoza, P., Vázquez, F.J., Rodellar, C., 2018. Assessment of effectiveness and safety of repeat administration of proinflammatory primed allogeneic mesenchymal stem cells in an equine model of chemically induced osteoarthritis. *BMC Vet. Res.* 14, 241.
- Berglund, A.K., Fisher, M.B., Cameron, K.A., Poole, E.J., Schnabel, L.V., 2017. Transforming growth Factor- β 2 downregulates major histocompatibility complex (MHC) I and MHC II surface expression on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells without altering other phenotypic cell surface markers. *Front. Vet. Sci.* 4, 84.
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., Klüter, H., 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27, 2331–2341.
- Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Mariën, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregón, A., Wuertz, K., Spaas, J.H., 2014. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One* 9, e85917.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B.C., Schallmoser, K., 2016. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387.
- Cassano, J.M., Fortier, L.A., Hicks, R.B., Harman, R.M., Van de Walle, G.R., 2018a. Equine mesenchymal stromal cells from different tissue sources display comparable immunerelated gene expression profiles in response to interferon gamma (IFN)- γ . *Vet. Immunol. Immunopathol.* 202, 25–30.
- Cassano, J.M., Schnabel, L.V., Goodale, M.B., Fortier, L.A., 2018b. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 33–39.
- Chou, M.L., Bailey, A., Avory, T., Tanimoto, J., Burnouf, T., 2015. Removal of transmissible spongiform encephalopathy prion from large volumes of cell culture media supplemented with fetal bovine serum by using hollow fiber anion-exchange membrane chromatography. *PLoS One* 10, e0122300.
- Del Bue, M., Riccò, S., Conti, V., Merli, E., Ramoni, R., Grolli, S., 2007. Platelet lysate

- promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet. Res. Commun.* 31, 289–292.
- de Mattos Carvalho, A., Alves, A.L.G., de Oliveira, P.G.G., Álvarez, L.E.C., Amorim, R.L., Hussni, C.A., Deffune, E., 2011. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.* 31, 26–34.
- De Rosa, A., De Francesco, F., Tirino, V., Ferraro, G.A., Desiderio, V., Paino, F., Pirozzi, G., D’Andrea, F., Papaccio, G., 2009. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng. Part C Methods* 15, 659–667.
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., Lataillade, J.-J., 2005. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236.
- Gilbertie, J.M., Long, J.M., Schubert, A.G., Berglund, A.K., Schaer, T.P., Schnabel, L.V., 2018. Pooled platelet-rich plasma lysate therapy increases synoviocyte proliferation and hyaluronic acid production while protecting chondrocytes from synoviocytederived inflammatory mediators. *Front. Vet. Sci.* 5 (150).
- Hemeda, H., Giebel, B., Wagner, W., 2014. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16, 170–180.
- Hemeda, H., Kalz, J., Walenda, G., Lohmann, M., Wagner, W., 2013. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy* 15, 1174–1181.
- Horn, P., Bokermann, G., Cholewa, D., Bork, S., Walenda, T., Koch, C., Drescher, W., Hutschenreuther, G., Zenke, M., Ho, A.D., Wagner, W., 2010. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 12, 888–898.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., Hofmann, T., 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. U. S. A.* 99, 8932–8937.
- Iudicone, P., Fioravanti, D., Bonanno, G., Miceli, M., Lavorino, C., Totta, P., Frati, L., Nuti, M., Pierelli, L., 2014. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* 12, 28.
- Jochems, C.E.A., van der Valk, J.B.F., Stafleu, F.R., Baumans, V., 2002. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab. Anim.* 30, 219–227.
- Joswig, A.-J., Mitchell, A., Cummings, K.J., Levine, G.J., Gregory, C.A., Smith 3rd, R., Watts, A.E., 2017. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 42.
- Lohmann, M., Walenda, G., Hemeda, H., Joussen, S., Drescher, W., Jockenhoevel, S., Hutschenreuter, G., Zenke, M., Wagner, W., 2012. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 7, e37839.
- Naskou, M.C., Sumner, S.M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., Galipeau, J., Peroni, J.F., 2018. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 75.

- Owens, S.D., Kol, A., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2016. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment induces specific alloantibodies in horses. *Stem Cells Int.* 2016, 5830103.
- Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martín-Burriel, I., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 147–154.
- Ranera, B., Ordovás, L., Lyahyai, J., Bernal, M.L., Fernandes, F., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Osta, R., Cons, C., Varona, L., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet. J.* 44, 33–42.
- Remacha, A.R., Barrachina, L., Álvarez-Arguedas, S., Ranera, B., Romero, A., Vázquez, F.J., Zaragoza, P., Yañez, R., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2015. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 165, 107–118.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., Shi, Y., 2010. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol.* 184, 2321–2328.
- Russell, K.A., Gibson, T.W.G., Chong, A., Co, C., Koch, T.G., 2015. Canine platelet lysate is inferior to fetal bovine serum for the isolation and propagation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 10, e0136621. Russell, K.A., Koch, T.G., 2016. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet. J.* 48, 261–264.
- Seo, J.-P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N., 2013. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 95, 693–698.
- Spees, J.L., Gregory, C.A., Singh, H., Tucker, H.A., Peister, A., Lynch, P.J., Hsu, S.-C., Smith, J., Prockop, D.J., 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 9, 747–756.
- Szabó, E., Fajka-Boja, R., Kriston-Pál, É., Hornung, Á., Makra, I., Kudlik, G., Uher, F., Katona, R.L., Monostori, É., Czibula, Á., 2015. Licensing by inflammatory cytokines abolishes heterogeneity of immunosuppressive function of mesenchymal stem cell population. *Stem Cells Dev.* 24, 2171–2180.
- Wang, C., Xiao, R., Cao, Y.L., Yin, H.Y., 2017. Evaluation of human platelet lysate and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants for the cryopreservation of human adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491, 198–203.

Table 1

Genes analyzed by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). GenBank accession numbers of the sequences used for primers design. Primer sequences (F: Forward and R: Reverse) and length of the amplicon in base pair (bp). Genes were grouped in agreement with the functions and implications of encoded molecules, in order to facilitate the posterior analysis: Housekeeping, characterization cell surface markers, antigen presenting-related molecules and immunomodulation-related molecules.

Gene	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size
Housekeeping			
B2M	NM_001082502.2	F:TCGTCCTGCTCGGGCTACT R:ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
GAPDH	NM_001163856	F:GGCAAGTTCCATGGCACAGT R:CACAACATATTCAGCACCAGCAT	128
Characterization cell surface markers			
CD44	NM_001085435	F:CCCACGGATCTGAAACAAGTG R:TTCTGGAATTTGAGGTCTCCGTAT	95
CD73	XM_001500115	F:GGGATTGTTGGATACACTTCAAAAG R:GCTGCAACGCAGTGATTTC	90
CD90	EU881920	F:TGCGAACTCCGCCTCTCT R:GCTTATGCCCTCGCACTTG	93
CD105	XM_001500078	F:GACGGAAAATGTGGTCAGTAATGA R:GCGAGAGGCTCTCCGTGTT	100
CD34	XM_001491596	F:CACTAAACCCTCTACATCATTTTCTC CTA R:GGCAGATACCTTGAGTCAATTTC	150
CD45	AY_114350	F:TGATTCCCAGAAATGACCATGTA R:ACATTTTGGGCTTGTCTGTAAC	100
Antigen presenting-related molecules			
MCH-I	AB525081	F:CGTGAGCATCATTGTTGGC R:TCCCTCTTTTTTCACCTGAGG	92
MCH-II	NM_001142816	F:AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R:CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172
CD40	AY514017	F:ACAAATACTGCGACCCCAACC R:TTTCACAGGCATCGCTGGA	114

Molecules related with the immunomodulatory ability			
COX-2	AB041771	F:GTTTGCATTTTTTGCCCAGC R:ACTTAAATCCACCCCGTGACC	103
IL-6	EU438770	F:AACAGCAAGGAGGTACTGGCA R:CAGGTCTCCTGATTGAACCCA	95
VCAM-1	DQ246452	F:TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R:TTGATGGTCTCCCCGATGA	127
iNOS	AY027883	F:CCAACAATGGCAACATCAGGT R:TGAGCATTCCAGATCCGGA	85
IDO	XM_001490681	F:TCATGACTACGTGGACCCAAAA R:CGCCTTCATAGAGCAGACCTTC	104

Table 2

Summary of cell doubling times (DT), in days, of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells (eBM-MSCs) cultured under the three different conditions from passage 1 (P₁) to passage 3 (P₃). The results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$) for each condition and each passage. Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

Supplement	DT (days)		
	P ₁	P ₂	P ₃
FBS	3.0 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.3 ^a	2.1 $\pm$ 0.1 ^{a,b}
CPL	2.5 $\pm$ 0.4 ^a	2.0 $\pm$ 0.1 ^a	1.7 $\pm$ 0.1 ^a
BPL	2.6 $\pm$ 0.0 ^a	4.5 $\pm$ 1.6 ^a	3.9 $\pm$ 0.6 ^b

Table 3

Summary of post-cryopreservation cell viability (percentage of viable cells) of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells (eBM-MSCs) in passage 3 frozen with 90% of fetal bovine serum (FBS) or concentrated platelet lysate (CPL) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). The results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$) for each condition and each passage. No significant differences were found.

Condition	Time cryopreservation		
	15 days	30 days	60 days
FBS	64.8 % $\pm$ 9.0	63.9 % $\pm$ 12.3	70 % $\pm$ 9.3
CPL	64.5 % $\pm$ 9.6	65.3 % $\pm$ 12.5	62.3 % $\pm$ 9.3

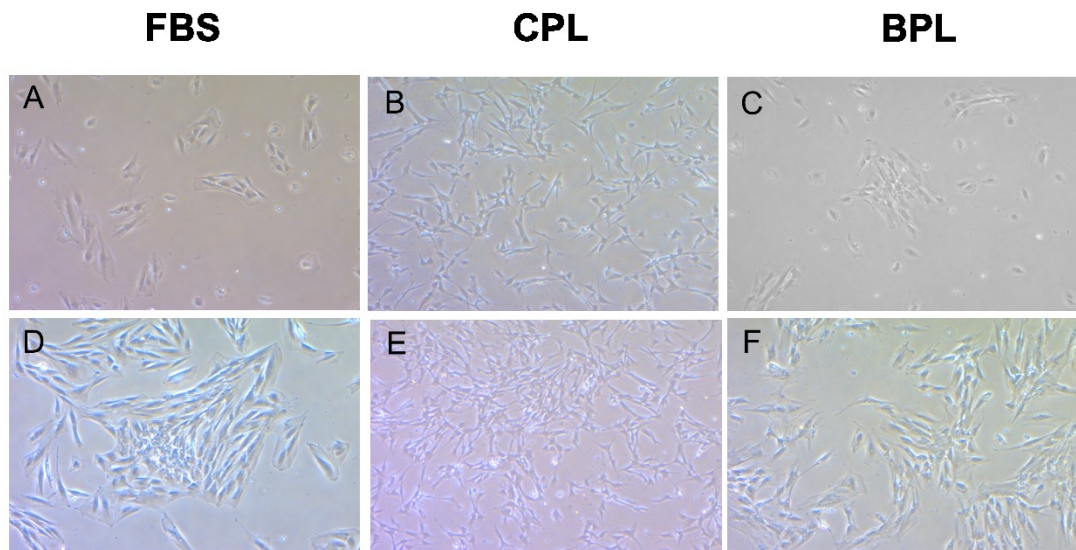


Fig1. Microscopic images (4×) of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells (eBM-MSCs) in passage 3 under the three different culture conditions. (A–C) Cells with low confluence; (D–F) Cells with intermediate confluence. The media were supplemented with fetal bovine serum (FBS, A and D) or concentrated platelet lysate (CPL, B and E) or basal platelet lysate (BPL, C and F).

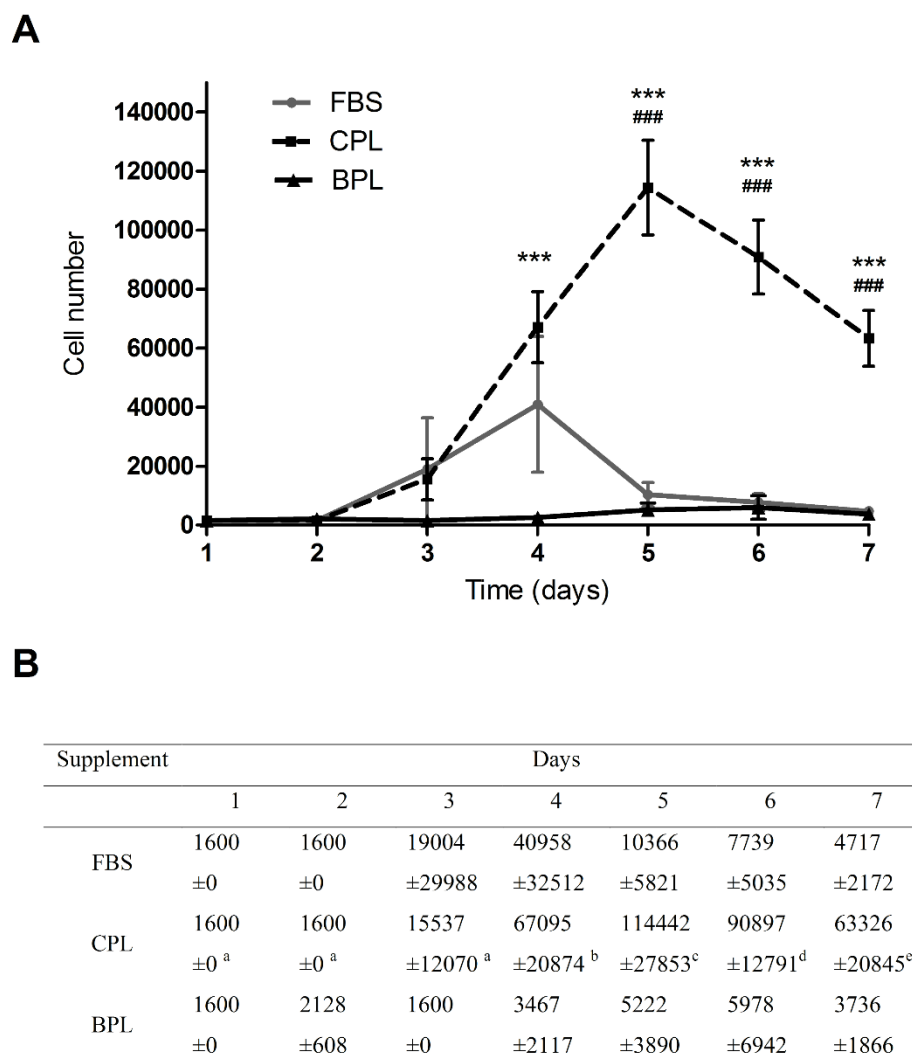


Fig. 2. Proliferation of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells (passage 3) cultured with fetal bovine serum (FBS) or concentrated platelet lysate (CPL) or basal platelet lysate (BPL) along 7 days in the MTT assay. The results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$) of the cell number reached at each time-point for each condition. A) Growth curve (FBS, gray line; CPL, black dotted line; BPL, black continuous line). Significant differences between CPL and BPL are indicated with * (***)= $P < 0.001$; significant differences between CPL and FBS are indicated with # (###)= $P < 0.001$. B) Table showing the cell numbers (numeric data) along culture period within each condition. Significant differences were found only for CPL condition; different letters indicate statistically significant differences between time-points ($P < 0.001$).

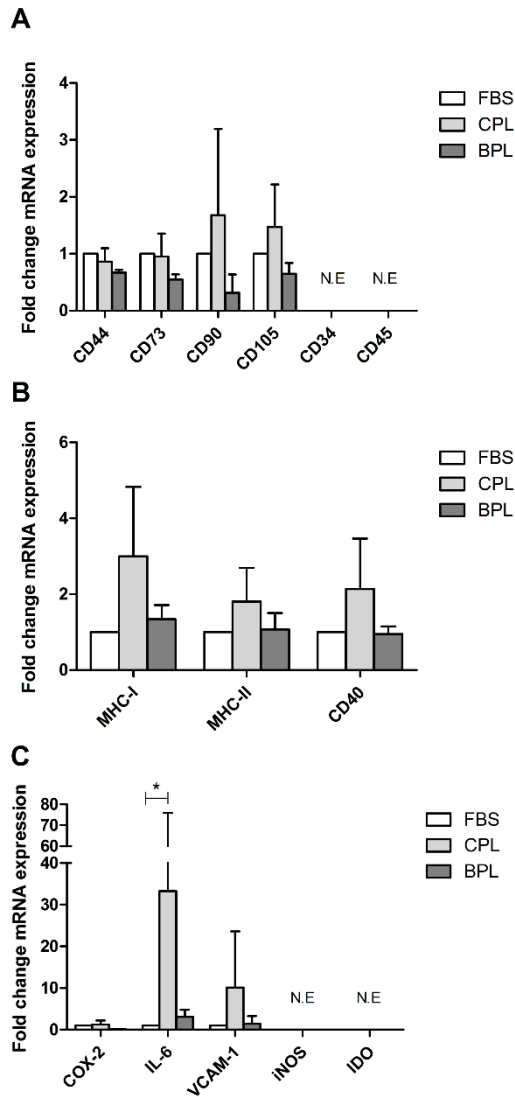


Fig. 3. Equine bone marrow derived mesenchymal stem cells (eBM-MSCs) gene expression studied by real time quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR) under the three culture conditions: fetal bovine serum (FBS), concentrated platelet lysate (CPL) and basal platelet lysate (BPL). Gene expression of all genes is shown as mean $\pm$ SD ($n = 3$) fold change regarding standard condition (FBS). (A) Expression of genes coding for cell surface markers related with MSC phenotype characterization. (B) Expression of genes coding for immunogenic-related molecules. (C) Expression of genes coding for immunomodulatory-related molecules. * = $P < 0.05$; N.E = no expression.

6.6 Discusión general

6.6.1 Caracterización *in vitro* de las MSCs en condiciones estándar

El TA como fuente de AD-MSCs es muy atractivo para los investigadores desde su primera descripción hecha por Zuk et al. (2001) debido a su fácil extracción y gran cantidad de MSCs (Bourin et al., 2013). En el presente trabajo para caninos y felinos (Manuscrito I y II) se optó por tomar muestras provenientes de hembras donantes, jóvenes, sanas sometidas a ovariectomía por profesionales veterinarios. En otros trabajos se ha utilizado dicha fuente en pequeños animales debido a que tiene la ventaja de ser una cirugía de rutina y permite la obtención de grandes cantidades de tejido sin la necesidad de someterlos a una cirugía únicamente para el aislamiento de MSCs (Martinello et al., 2011; Guercio et al., 2013; Arzi et al., 2016; Clark et al., 2017). Nos parece un aspecto interesante ya que está alineado con los principios internacionales aceptados de bienestar animal de 3 Rs (Kirk, 2018). Asimismo, haciendo una comparación con medicina humana para la extracción en la que se aprovecha una cirugía estética en muchos casos, como es la liposucción, permite extraer grandes cantidades de TA sin tener que someter al individuo a una cirugía exclusivamente para la toma de muestra (Priya et al., 2014; Schneider et al., 2017). Por otro lado, en equinos la extracción de tejido adiposo fue hecha *post-mortem* (animales destinados a faena) de la base de la cola en la región supraglútea, el cual es un sitio de extracción ya descrito por otros autores (Vidal et al., 2007; Alipour et al., 2015). Por último, en el Manuscrito IV se utilizaron muestras de médula ósea para la extracción de BM-MSCs de la zona del esternón, la cual es una fuente utilizada frecuentemente en esta especie (Barberini et al., 2014; Sherman et al., 2017).

En nuestros resultados para todos los manuscritos de la tesis se puede observar la morfología tipo fibroblástica y adherencia al plástico típico de las MSCs para las tres especies. Además, se pudo comprobar para las AD-MSCs de las tres especies su capacidad clonogénica *in vitro* descrito en el Manuscrito I, ellas presentaron la capacidad de formar colonias en cultivo evidenciado con la prueba de CFU-F y en coincidencia a lo descrito para caninos (Guercio et al., 2013; James et al., 2017), equinos (Vidal et al., 2007; Alipour et al., 2015) y felinos (Martin et al., 2002). Por otro lado, para evaluar la multipotencialidad *in vitro* de estas células fueron inducidas artificialmente a los linajes adipogénicos, condrogénico y osteogénico, conocida como la prueba de tridiferenciación *in vitro*. En los manuscritos I, II y III fue evaluada la multipotencialidad *in vitro* y se pudo comprobar su capacidad para las tres especies en coincidencia a otras descripciones para especies domésticas que lo consiguieron en caninos (Vieira et al., 2010; Screven et al., 2014), equinos (Alipour et al., 2015; Hillmann et al., 2016) y felinos (Kono et al., 2014; Kim et al., 2017).

6.6.2 Inmunofenotipificación de las MSCs en condiciones estándar

Otro de los aspectos evaluados de las MSCs fueron sus marcadores de superficie, si bien no existe un solo marcador específico de células madre, lo que sí existe es una batería de marcadores típicos de las MSCs como el CD13, CD73, CD90 y CD105 que deben presentar y no deben presentar en su superficie los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, según las recomendaciones internacionales para humanos (Bourin et al., 2013). En las especies domésticas, la situación no está totalmente resuelta debido a que se han adoptado los marcadores de MSCs humanas no contemplando las diferencias interespecie, sumado a problemas de reacción cruzada debido a la escasa oferta de anticuerpos diseñados específicamente para

cada especie (Requicha et al., 2012; Screven et al., 2014; Hillmann et al., 2016; Clark et al., 2017). En los manuscritos II y IV fueron medidos los marcadores de superficie de las MSCs caninas y equinas, respectivamente. Para las MSCs caninas se determinó un inmunofenotipo CD44⁺, CD90⁺ y CD45⁻ por citometría de flujo, estos resultados coinciden con otras descripciones en la literatura (Vieira et al., 2010; Takemitsu et al., 2012; Screven et al., 2014). En el caso de MSCs equinas se determinó la expresión génica de los siguientes marcadores: CD44, CD73, CD90 y CD105, y no expresión de CD34 y CD45, este perfil fue determinado a través de RT-qPCR y coincide con otras descripciones (Remacha et al., 2015; Barrachina et al., 2016). Además, la medición de expresión génica para determinar el inmunofenotipo de las MSCs ya ha sido utilizada por otros trabajos dando una alternativa a las dificultades anteriormente mencionadas sobre los anticuerpos específicos para especies domésticas (Ranera et al., 2011; Requicha et al., 2012; Lee et al., 2014).

Nuestros resultados en el Manuscrito II indicaron que las AD-MSCs provenientes de Sc y Vs presentaban un inmunofenotipo con la presencia de CD44⁺, CD90⁺ y ausencia CD45⁻. En el caso del CD44 lo presentaban >90 % de las células coincidiendo con otros autores (Takemitsu et al., 2012; Screven et al., 2014). Por otro lado, el CD90 se observó en >70 % población mostrando discrepancias con la literatura. Existen trabajos en caninos con un mayor porcentaje de células positivas a este marcador (Vieira et al., 2010) y también con porcentajes sensiblemente menores de 35% (Martinello et al., 2011) y 22,55% (Takemitsu et al., 2012). Estas discrepancias pueden deberse a la gran variación que se reporta de este marcador para caninos (Screven et al., 2014), en contradicción al alto porcentaje de CD90 descrito para MSCs humanas (Bourin et al., 2013).

Por otro lado, se observó que el sitio anatómico de origen de las AD-MSCs afecta su capacidad de multipotencialidad. En este trabajo, se determinó que la fuente Sc poseía mayor capacidad de síntesis de matriz ósea *in vitro* en comparación a la fuente Vs. En coincidencia con lo descrito por otros autores que encontraron una mayor expresión génica de biomarcadores (COLIA1 y RUNX2) de diferenciación ósea en la fuente Sc en comparación en la Vs para caninos (Requicha et al. 2012) y humanos (Baglioni et al. 2012). Sin embargo, otro reporte describe que las fuentes Sc y Vs presentan similar capacidad para humanos (Baglioni et al., 2009). En contraposición, a lo observado en lepóridos donde se describe a la fuente Vs con mayor capacidad de síntesis de matriz ósea *in vitro* comparada con las de origen Sc (Peptan et al., 2006). Entonces, existen discrepancias que pueden deberse a que fueron evaluadas especies y pasajes celular diferentes. Asimismo, sería interesante profundizar sobre las fuentes que poseen mayor potencial osteogénico debido a su gran atractivo para ser utilizadas en medicina ortopédica.

6.6.3 Caracterización *in vitro* de las MSCs cultivadas con PL alogénico

Otro punto central de la presente tesis fue la evaluación de medio libre de componentes xenogénicos (conocidas internacionalmente como *xeno-free culture*) buscando reemplazar al FBS por el lisado plaquetario (*platelet lysate*; PL) alogénico. Los resultados descritos en los Manuscritos III y IV indican que PL alogénico utilizado como suplemento de cultivo para la propagación *ex vivo* AD-MSCs y BM-MSCs es un buen candidato debido a que las células presentaron perfil similar a las condiciones estándar con el clásico suplemento en coincidencia con otros autores en equinos (Del Bue et al., 2007; Seo et al., 2013; Naskou et al., 2018) y humanos (Hemeda et al., 2014; Iudicone et al., 2014). En estos manuscritos se utilizaron diferentes tipos de presentaciones de PL, una de ellas fue hecho a menor

concentración que lo descrito en la literatura, debido a que utilizamos un pool de lisado plaquetario a concentración basal (*basal platelet lysate*: BPL) con 96×10^3 platelets/ μL (Manuscrito III) y 177×10^3 platelets/ μL (Manuscrito IV) siendo inferiores a las descritas en la literatura para cultivar MSCs de 1000×10^3 platelets/ μL denominado lisado plaquetario concentrado (*concentrated platelet lysate*: CPL) (Seo et al., 2013; Russell and Koch, 2016; Naskou et al., 2018), pero en nuestro caso el método de preparación fue más sencillo debido que requiere una sola centrifugación y posterior separación del plasma, por el contrario el CPL en general requiere un procedimiento de doble centrifugación. En la mayoría de los trabajos publicados se utiliza el CPL debido a que se eleva la cantidad de factores de crecimiento plaquetarios y así se promueve la proliferación *in vitro* de las MSCs (Russell and Koch, 2016). A pesar de ello, en nuestros dos manuscritos se demostró que es posible la proliferación *in vitro* de las AD-MSCs y BM-MSCs con BPL. Por último, vemos necesario continuar profundizando con la composición del PL y cuál es la concentración óptima de plaquetas en el cultivo de MSCs debido que existen diversas formulaciones descritas (Burnouf et al., 2016).

En los resultados descritos en el Manuscrito III, se comparó el FBS vs BPL en sucesivos pasajes celulares para AD-MSCs equinas y se observó que presentaban un DT muy similar entre ambas condiciones, encontrando solo en P₂ y P₄ una diferencia significativa con un menor tiempo de duplicación por parte del BPL. Asimismo, en el Manuscrito IV cuando se comparó al FBS vs BPL en BM-MSCs equinas y se observó un comportamiento similar entre ambas condiciones. Para estos resultados del uso de BPL no tenemos antecedentes descritos sobre su uso como suplemento en células equinas hasta el momento. Por otro lado, en el Manuscrito IV se comparó la cinética de crecimiento con CPL vs BPL. En primer lugar, se observó que la condición CPL permitió mayor cinética de crecimiento que BPL a través de la determinación del DT en sucesivos pasajes y la evaluación de la cantidad de células a lo largo del tiempo a través de la prueba de MTT para viabilidad celular. Esta diferencia observada podría deberse a que el CPL contiene una alta concentración de factores plaquetarios de los que se destacan el factor de PDGF y el bFGF los cuales se encuentran en sus gránulos alfa (Russell and Koch, 2016). De todas maneras, como no fueron medidos los factores de crecimiento en este trabajo no podremos comprobar esta hipótesis, pero sí podemos asociarlo debido a que en nuestras condiciones se concentró 3,3 veces más plaquetas en el CPL. Asimismo, en el trabajo de Russell and Koch (2016) determinaron la concentración de PDGF del CPL para equinos y observaron un significativo aumento de la concentración en comparación al PRP, esto podría deberse a que el PL fue sometido al menos a un ciclo de congelado/descongelado para que se liberen los factores de crecimiento, por ello, no solo es importante la concentración plaquetaria sino también el proceso por el cual se consigue la liberación los factores mencionados, este procedimiento ya ha sido descrito por otros autores (Hemeda et al., 2014; Burnouf et al., 2016).

La xenocontaminación en el cultivo de MSCs presenta una dificultad para el desarrollo de terapias celulares seguras, es por ello que se han desarrollado diferentes medios de cultivo libres de xenoproteínas o incluso libre de proteína animal, pero no solo es importante utilizar un reemplazo de sustituto en la propagación *ex vivo*, sino que también es importante el desarrollo de biobancos libres de proteínas xenogénicas. Por ello en el Manuscrito IV se evaluó el uso de PL como medio de criopreservación. Nuestros resultados indicaron que el uso de 90% CPL y 10% DMSO como medio de criopreservación se obtiene unos resultados alentadores ya que el porcentaje de viabilidad de las MSCs post-congelación no presentaron diferencias significativas en comparación a las células criopreservadas

con FBS. Asimismo, sólo existe un antecedente para equinos el trabajo de Naskou et al. (2018) en el cual describen haber congelado las MSCs en 90% CPL y 10% DMSO, sin embargo, no evaluaron la viabilidad de las células post-congelación. Por otra parte, en humanos recientemente fue evaluado el PL junto al DMSO como medio de criopreservación y encontraron que la viabilidad era satisfactoria y similar al obtenido con el FBS (Wang et al., 2017), lo que coincide con nuestros hallazgos. Finalmente, existen escasos reportes que evalúan al PL como agente criopreservante en animales domésticos y humanos por lo que sería necesario profundizar sobre este punto para permitir el desarrollo de biobancos libre de xenocontaminación. Sin embargo, en el caso del uso de donantes de la misma especie para obtener el PL no se evita la alocontaminación, por ello, el uso autólogo sería la condición ideal para evitar la inclusión de proteínas extrañas.

6.6.4 Perfil inmunológico de las MSCs cultivadas con PL como suplemento

Una de las características atractivas de las MSCs para su uso terapéutica es la capacidad de modular el sistema inmune y adquirir un perfil inmuno-evasivo. Por ello, se profundizaron los aspectos inmunológicos de las MSCs en condiciones de medio libre de componentes xenogénicos. En el Manuscrito IV se evaluó la expresión de genes vinculados a la inmunogenicidad e inmunomodulación de las BM-MSCs equinas. En primer lugar, nuestros resultados evidenciaron que las células cultivadas en las 3 condiciones (FBS, CPL y BPL) presentaron la expresión génica de MHC-I, MHC-II y CD40, es importante mencionar que la condición CPL presentó niveles más altos que el resto de las otras, pero de todas maneras no se observaron diferencias significativas. Estos resultados coinciden con otros autores observaron cambios en el perfil inmunogénico de las MSCs ante un estímulo proinflamatorio aumentando la expresión de marcadores inmunogénicos/inmunomoduladores (Barrachina et al., 2016; Berglund et al., 2017). Por otro lado, como antecedente del perfil fenotípico de las MSCs equinas tenemos el trabajo de Naskou et al. (2018) que en sus resultados hallaron una expresión similar de MHC II en las condiciones CPL o FBS, coincidiendo con nuestros resultados.

Otro de los aspectos evaluados en el Manuscrito IV fue el perfil inmunomodulador que tenían las BM-MSCs equinas en las tres diferentes condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. En este caso se evaluó la expresión de genes vinculados a las moléculas inmunomoduladoras y se observó que en la condición CPL existió un aumento de VCAM-1 (no significativo) e IL-6 (significativo). Si tomamos estos resultados y los asociamos al aumento de expresión de genes inmunogénicos podemos hipotetizar que las BM-MSCs equinas en la condición CPL recibieron un estímulo similar al proinflamatorio basado en los antecedentes descritos, los cuales, determinan un aumento de estos mismos marcadores cuando existen condiciones proinflamatorias, en especial cuando se promueve la señalización celular por la vía TLR-4 (Berglund et al., 2017; Cassano et al., 2018a, 2018b). Además, existe una coincidencia con nuestros resultados por parte de los trabajos de Barrachina *et al* (Barrachina et al., 2016, 2017b) ya que ellos estimulan a las MSCs equinas con citoquinas proinflamatorias y ven un aumento de MHC-II, IL-6 y VCAM-1. Sin embargo, ven también el aumento de otros genes como COX-2, IDO e iNOS en discordancia con nuestros resultados ya que observamos una expresión similar de COX-2 y no detectamos expresión de IDO e iNOS. Entonces, en base a estos hallazgos podemos hipotetizar que al concentrar plaquetas en el CPL se consigue aumentar la concentración de factores de crecimiento, pero a la vez, se concentraron otras moléculas bioactivas proinflamatorias, como IL-8, que se encuentran en los

gránulos alfa de las plaquetas (Nurden et al., 2008; Burnouf et al., 2016). Además, al concentrar plaquetas en el CPL ocurrió lo mismo con los leucocitos, observando 4,5 veces más que en las condiciones basales. Por lo que, potencialmente incorporaría citoquinas residuales provenientes de los leucocitos al CPL. Entonces, esta concentración de moléculas bioactivas proinflamatorias potencialmente podría haber modificado el perfil inmunogénico/inmunomodulador de las BM-MSCs para la condición CPL comparado con la BPL. Por último, esta hipótesis no fue probada en la presente tesis debido a que no se midieron moléculas bioactivas presentes en el PL. Esto nos indica la importancia de que en futuros estudios debemos profundizar sobre la composición del PL debido a que tiene un impacto sobre el perfil de las MSCs y potencialmente podría ser beneficioso para su uso terapéutico, ya que un estímulo proinflamatorio potencia su capacidad inmunomoduladora, como se ha demostrado en otros estudios (Berglund et al., 2017; Barrachina et al., 2018; Cassano et al., 2018b).

7. CONCLUSIONES GENERALES

Para una mayor claridad, se muestran a continuación las conclusiones obtenidas de forma separada para cada una de las especies estudiadas en la presente tesis doctoral:

CANINA

1. Ha sido posible aislar, caracterizar y criopreservar las AD-MSCs, evidenciando su adherencia al plástico, capacidad clonogénica y multipotencialidad *in vitro*.
2. Se ha determinado que el perfil inmunofenotípico de las AD-MSCs, el cual, fue similar para las fuentes Sc y Vs.
3. Los pasajes celulares sucesivos tuvieron un efecto negativo sobre la multipotencialidad *in vitro* de las AD-MSCs para ambas fuentes.
4. Las AD-MSCs de origen Sc presentaron capacidad de tridiferenciación *in vitro* con mayor longevidad de pasajes celulares y una mayor capacidad de formación de matriz ósea *in vitro* en comparación a las de origen Vs.

EQUINA

1. Ha sido posible aislar, caracterizar y criopreservar las AD-MSCs, evidenciando su adherencia al plástico, capacidad clonogénica y multipotencialidad *in vitro*.
2. Fue posible cultivar con BPL como suplemento de medio cultivo a AD-MSCs y BM-MSCs.
3. Las AD-MSCs conservaron su multipotencialidad *in vitro* y presentaron una cinética de crecimiento similar en sucesivos pasajes cultivadas con BPL alogénico en comparación a la condición estándar de FBS.
4. Las BM-MSCs presentaron una cinética de crecimiento similar en sucesivos pasajes cultivadas con BPL y FBS. En cambio, en cuando eran cultivadas con CPL presentaron una mayor capacidad proliferativa que BPL y FBS.
5. Se ha descrito por primera vez el perfil inmunogénico e inmunomodulador de las BM-MSCs cultivadas con CPL o BPL y el principal hallazgo observado fue que las células en la condición CPL adquieren un perfil similar al inducido en un contexto proinflamatorias *in vitro*.

FELINA

1. Ha sido posible aislar, caracterizar y criopreservar las AD-MSCs, evidenciando su adherencia al plástico, capacidad clonogénica y multipotencialidad *in vitro*.

8. PERSPECTIVAS

Para una mejor comprensión se dividirán las perspectivas en las tres especies estudiadas:

- a) En caninos se pretende continuar explorando las variables de sitio de extracción sobre otras propiedades de relevancia terapéutico como son su inmunogenicidad y potencial inmunomodulador. Actualmente, se está trabajando en un proyecto investigación estudiantil (PAIE CSIC-Udelar) evaluando el uso de PL alogénico como alternativa para la propagación *ex vivo* de las MSCs.
- b) En equinos se encuentra en marcha la ejecución de un proyecto de investigación (CSIC I+D) financiado para continuar con la profundización sobre el uso de PL alogénico y el impacto que tiene sobre las propiedades inmunológicas de las MSCs.
- c) En felinos se pretende profundizar aspectos básicos como su cinética de crecimiento *in vitro* y caracterización de diferentes fuentes. En la actualidad, se está trabajando intensamente sobre esta especie en una tesis de maestría del PPFV, Udelar, la cual estoy cotutorando.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alipour, F., Parham, A., Kazemi Mehrjerdi, H., Dehghani, H., 2015. Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell J.* 16, 456–465.
- Anderson, P., Souza-Moreira, L., Morell, M., Caro, M., O'Valle, F., Gonzalez-Rey, E., Delgado, M., 2013. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 62, 1131–1141.
- Ankrum, J.A., Ong, J.F., Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*. 32, 252.
- Ankrum, J., Karp, J.M., 2010. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol. Med.* 16, 203–209.
- Arzi, B., Mills-Ko, E., Verstraete, F.J.M., Kol, A., Walker, N.J., Badgley, M.R., Fazel, N., Murphy, W.J., Vapniarsky, N., Borjesson, D.L., 2016. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 75–86.
- Astori, G., Amati, E., Bambi, F., Bernardi, M., Chiericato, K., Schäfer, R., Sella, S., Rodeghiero, F., 2016. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res. Ther.* 7, 93.
- Atashi, F., Jaconi, M.E.E., Pittet-Cuénod, B., Modarressi, A., 2015. Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 253–262.
- Badillo, A.T., Beggs, K.J., Javazon, E.H., Tebbets, J.C., Flake, A.W., 2007. Murine Bone Marrow Stromal Progenitor Cells Elicit an In Vivo Cellular and Humoral Alloimmune Response. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 13, 412–422.
- Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Di Franco, A., Borgogni, E., Frontera, S., Nesi, G., Liotta, F., Lucchese, M., Perigli, G., Francini, F., Forti, G., Serio, M., Luconi, M., 2012. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One* 7, e36569.
- Baglioni, S., Francalanci, M., Squecco, R., Lombardi, A., Cantini, G., Angeli, R., Gelmini, S., Guasti, D., Benvenuti, S., Annunziato, F., Bani, D., Liotta, F., Francini, F., Perigli, G., Serio, M., Luconi, M., 2009. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *The FASEB Journal*. 23, 3494–3505.
- Baker, M., 2016. Reproducibility: Respect your cells! *Nature* 537, 433–435.
- Barberini, D.J., Freitas, N.P.P., Magnoni, M.S., Maia, L., Listoni, A.J., Heckler, M.C., Sudano, M.J., Golim, M.A., da Cruz Landim-Alvarenga, F., Amorim, R.M., 2014. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 25.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Gosálvez, J., Roy, R., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2017a. Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells Dev.* 26, 15–24.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2017b. Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implications in intra-articular treatments. *J. Vet. Sci.* 18, 39–49.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2016. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 171, 57–65.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Roca, M., Zaragoza, P., Vázquez, F.J., Rodellar, C., 2018. Assessment of effectiveness and safety of repeat administration of proinflammatory primed allogeneic mesenchymal stem cells in an equine model of chemically induced osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*. 14, 241.
- Berglund, A.K., Fisher, M.B., Cameron, K.A., Poole, E.J., Schnabel, L.V., 2017. Transforming Growth Factor- β 2 Downregulates Major Histocompatibility Complex (MHC) I and MHC II Surface Expression on Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Without Altering Other Phenotypic Cell Surface Markers. *Front Vet Sci* 4, 84.
- Besalti, O., Aktas, Z., Can, P., Akpınar, E., Elcin, A.E., Elcin, Y.M., 2016. The use of autologous

- neurogenically-induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of paraplegic dogs without nociception due to spinal trauma. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 1465–1473.
- Beyth, S., 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105, 2214–2219.
- Bošković, A., Eid, A., Pontabry, J., Ishiuchi, T., Spiegelhalter, C., Raghu Ram, E.V.S., Meshorer, E., Torres-Padilla, M.E., 2014. Higher chromatin mobility supports totipotency and precedes pluripotency in vivo. *Genes Dev.* 28, 1042–1047.
- Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K., Gimble, J.M., 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15, 641–648.
- Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Mariën, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregón, A., Wuertz, K., Spaas, J.H., 2014. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One* 9, e85917.
- Bunnell, B.A., Betancourt, A.M., Sullivan, D.E., 2010. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1, 34.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M.B.C., Schallmoser, K., 2016. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 76, 371–387.
- Čamernik, K., Marc, J., Zupan, J., 2018. Human Skeletal Muscle-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell Isolation and Growth Kinetics Analysis. *Methods Mol. Biol.* 2018, 1–11.
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res.* 9, 641–650.
- Caplan, A.I., 2017. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1445–1451.
- Cassano, J.M., Fortier, L.A., Hicks, R.B., Harman, R.M., Van de Walle, G.R., 2018a. Equine mesenchymal stromal cells from different tissue sources display comparable immune-related gene expression profiles in response to interferon gamma (IFN)- γ . *Vet. Immunol. Immunopathol.* 202, 25–30.
- Cassano, J.M., Schnabel, L.V., Goodale, M.B., Fortier, L.A., 2018b. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 195, 33–39.
- Cengiz, I.F., Oliveira, J.M., Reis, R.L., 2018. PRP Therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1059, 241–253.
- Chou, M.L., Bailey, A., Avory, T., Tanimoto, J., Burnouf, T., 2015. Removal of transmissible spongiform encephalopathy prion from large volumes of cell culture media supplemented with fetal bovine serum by using hollow fiber anion-exchange membrane chromatography. *PLoS One* 10, e0122300.
- Clark, K.C., Fierro, F.A., Ko, E.M., Walker, N.J., Arzi, B., Tepper, C.G., Dahlenburg, H., Cicchetto, A., Kol, A., Marsh, L., Murphy, W.J., Fazel, N., Borjesson, D.L., 2017. Human and feline adipose-derived mesenchymal stem cells have comparable phenotype, immunomodulatory functions, and transcriptome. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 69.
- ClinalTrials. available in: <https://clinicaltrials.gov/>, date of consultation 24/05/2019.
- Del Bue, M., Riccò, S., Conti, V., Merli, E., Ramoni, R., Grolli, S., 2007. Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 289–292.
- De Schauwer, C., Van de Walle, G.R., Van Soom, A., Meyer, E., 2013. Mesenchymal stem cell therapy in horses: useful beyond orthopedic injuries? *Vet. Q.* 33, 234–241.
- De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H., 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174, 101–109.
- Ding, J., Ghali, O., Lencel, P., Broux, O., Chauveau, C., Devedjian, J.C., Hardouin, P., Magne, D., 2009. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci.* 84, 499–504.
- 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.
- Dora, A.B., Benedetti, D.T., Viana, D.C., Fratini, P., 2015. Use of Mesenchymal Stem Cells from Canine Bone Marrow Associated with the Use of Metallic Implants in the Repair of Distal Radius and Ulna Fractures in Toy Breed Dogs. *Cell.* 2015.

- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., Lataillade, J.-J., 2005. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236.
- Dowling, B.A., Dart, A.J., Hodgson, D.R., Smith, R.K.W., 2010. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Veterinary Journal.* 32, 369–378.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., Józkowicz, A., 2015. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim. Pol.* 62, 329–337.
- Eagle, H., 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501–514.
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., Galipeau, J., 2005. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106, 4057–4065.
- Escalhão, C.C.M., Ramos, I.P., Hochman-Mendez, C., Brunswick, T.H.K., Souza, S.A.L., Gutflen, B., Dos Santos Goldenberg, R.C., Coelho-Sampaio, T., 2017. Safety of Allogeneic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cells Int.* 2017, 3053759.
- Fernandez, S., Ríos M. (2016). Comparación de suero fetal bovino y lisado plaquetario alogénico en el cultivo de células madre mesenquimales equinas Thesis, FVET, Udelar, Montevideo, Uruguay.
- François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., Galipeau, J., 2012. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol. Ther.* 20, 187–195.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., Keiliss-Borok, I.V., 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331–340.
- Graham, C.D., Fauza, D.O., 2015. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Amniotic Fluid and Placenta. *Current Protocols in Stem Cell Biology.* 1, 1E–2.
- Guercio, A., Di Bella, S., Casella, S., Di Marco, P., Russo, C., Piccione, G., 2013. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol. Int.* 37, 789–798.
- Gupta, N., Su, X., Popov, B., Lee, J.W., Serikov, V., Matthay, M.A., 2007. Intrapulmonary Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Survival and Attenuates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *The Journal of Immunology.* 179, 1855–1863.
- Gur-Wahnon, D., Borovsky, Z., Liebergall, M., Rachmilewitz, J., 2009. The induction of APC with a distinct tolerogenic phenotype via contact-dependent STAT3 activation. *PLoS One* 4, e6846.
- Hemeda, H., Giebel, B., Wagner, W., 2014. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16, 170–180.
- Hillmann, A., Ahrberg, A.B., Brehm, W., Heller, S., Josten, C., Paebst, F., Burk, J., 2016. Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model. *Cell Transplant.* 25, 109–124.
- Hodgson, J., 1995. To Treat or Not to Treat: That Is the Question for Serum. *Nature Biotechnology.* 13, 334.
- Iso, Y., Spees, J.L., Serrano, C., Bakondi, B., Pochampally, R., Song, Y.-H., Sobel, B.E., Delafontaine, P., Prockop, D.J., 2007. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 700–706.
- Iudicone, P., Fioravanti, D., Bonanno, G., Miceli, M., Lavorino, C., Totta, P., Frati, L., Nuti, M., Pierelli, L., 2014. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med.* 12, 28.
- Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J.M., Bunnell, B.A., 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry.* 99, 1285–1297.
- James, A.W., Zhang, X., Crisan, M., Hardy, W.R., Liang, P., Meyers, C.A., Lobo, S., Lagishetty, V., Childers, M.K., Asatrian, G., Ding, C., Yen, Y.-H., Zou, E., Ting, K., Peault, B., Soo, C., 2017. Isolation and characterization of canine perivascular stem/stromal cells for bone tissue engineering. *PLoS One* 12, e0177308.
- Jochems, C.E.A., van der Valk, J.B.F., Stafleu, F.R., Baumanns, V., 2002. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern. Lab. Anim.* 30, 219–227.
- Joswig, A.J., Mitchell, A., Cummings, K.J., Levine, G.J., Gregory, C.A., Smith, R., Watts, A.E.,

2017. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy*. 8, 42.
- Kang, B.-J., Ryu, H.-H., Park, S.S., Koyama, Y., Kikuchi, M., Woo, H.-M., Kim, W.H., Kweon, O.-K., 2012. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science*. 13, 299–310.
- Kawashima, N., Noda, S., Yamamoto, M., Okiji, T., 2017. Properties of Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells and the Effects of Culture Conditions. *J. Endod.* 43, 31–34.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K., 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 24, 1294–1301.
- Kim, H.-R., Lee, J., Byeon, J.S., Gu, N.-Y., Lee, J., Cho, I.-S., Cha, S.-H., 2017. Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* 18, 299–306.
- Kim, J.B., Greber, B., Araújo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., Schöler, H.R., 2009. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–643.
- Kirk, R.G.W., 2018. Recovering: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci. Technol. Human Values* 43, 622–648.
- Koller, M.R., Maher, R.J., Manchel, I., Oxender, M., Smith, A.K., 1998. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J. Hematother.* 7, 413–423.
- Kondo, Y., Toyoda, T., Inagaki, N., Osafune, K., 2018. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *J. Diabetes Investig.* 9, 234–243.
- Kong, C.-M., Subramanian, A., Biswas, A., Stunkel, W., Chong, Y. S., Bongso, A., Fong, C.Y., 2019. Changes in Stemness Properties, Differentiation Potential, Oxidative Stress, Senescence and Mitochondrial Function in Wharton's Jelly Stem Cells of Umbilical Cords of Mothers with Gestational Diabetes Mellitus. *Stem Cell Reviews and Reports*. 1–12.
- Kono, S., Kazama, T., Kano, K., Harada, K., Uechi, M., Matsumoto, T., 2014. Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. *Vet. J.* 199, 88–96.
- Kumar, S., Geiger, H., 2017. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol. Med.* 23, 799–819.
- Lacey, D.C., Simmons, P.J., Graves, S.E., Hamilton, J.A., 2009. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 735–742.
- Lee, B.-Y., Li, Q., Song, W.-J., Chae, H.-K., Kweon, K., Ahn, J.-O., Youn, H.-Y., 2018. Altered properties of feline adipose-derived mesenchymal stem cells during continuous in vitro cultivation. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 930–938.
- Lee, K.S., Kang, H.W., Lee, H.T., Kim, H.J., Kim, C.L., Song, J.Y., Lee, K.W., Cha, S.H., 2014. Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 96, 267–275.
- Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M.L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2008. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 26, 279–289.
- Lohmann, M., Walenda, G., Hemeda, H., Jousen, S., Drescher, W., Jockenhoevel, S., Hutschenreuter, G., Zenke, M., Wagner, W., 2012. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* 7, e37839.
- Lombardo, E., De la Rosa, O., Mancheno-Corvo, P., Menta, R., Ramirez, C., Büscher, D., 2008. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Engineering Part A*. 15, 1579–1589.
- Luo, L., Hu, D.-H., Yin, J.Q., Xu, R.-X., 2018. Molecular Mechanisms of Transdifferentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Neural Cells: Current Status and Perspectives. *Stem Cells Int.* 2018, 5630802.
- Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P., Baker, H.J., 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., Decaminada, M., Patruno, M., 2011. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not

- lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res. Vet. Sci.* 91, 18–24.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology.* 177, 7303–7311.
- Marx, C., Silveira, M.D., Beyer Nardi, N., 2015. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev.* 24, 803–813.
- Mohamed, S.A., Shalaby, S., Brakta, S., Elam, L., Elsharoud, A., Al-Hendy, A., 2019. Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as an Infertility Treatment for Chemotherapy Induced Premature Ovarian Insufficiency. *Biomedicines.* 106, 128e.
- Naskou, M.C., Sumner, S.M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., Galipeau, J., Peroni, J.F., 2018. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 75.
- Neupane, M., Chang, C.-C., Kiupel, M., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2008. Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A.* 14, 1007–1015.
- Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E., Ward, D.L., 2008. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 69, 928–937.
- Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C., Cousin, B., 2008. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp. Cell Res.* 314, 1575–1584.
- Nurden, A.T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., Anitua, E., 2008. Platelets and wound healing. *Front. Biosci.* 13, 3532–3548.
- Olarerin-George, A.O., Hogenesch, J.B., 2015. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Research.* 43, 2535–2542.
- One Health Initiative. available in: <http://www.onehealthinitiative.com>, date of consultation 24/05/2019.
- Pachón-Peña, G., Yu, G., Tucker, A., Wu, X., Vendrell, J., Bunnell, B.A., Gimble, J.M., 2011. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J. Cell. Physiol.* 226, 843–851.
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., Carlucci, F., Petrini, M., 2007. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 13, 2949–2955.
- Paebst, F., Piehler, D., Brehm, W., Heller, S., Schroeck, C., Tárnok, A., Burk, J., 2014. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry Part A.* 85, 678–687.
- Panasophonkul, S., Samart, P., Kongon, K., Sathanawongs, A., 2017. Phenotypic characteristics of feline adipose-derived stem cells affected by cell passage number. *Pol. J. Vet. Sci.* 20, 651–660.
- Peptan, I.A., Hong, L., Mao, J.J., 2006. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 1462–1470.
- Petrakova, K.V., Tolmacheva, A.A., Ya. Fridenshtein, A., 1963. Osteogenesis following transplantation of marrow in diffusion chambers. *Bull. Exp. Biol. Med.* 56, 1375–1378.
- Priya, N., Sarcar, S., Majumdar, A.S., SundarRaj, S., 2014. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8, 706–716.
- PubMed. United States National Library of Medicine (NLM): <http://www.onehealthinitiative.com>, date available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> with Stor by: best match con los Filters activated: Abstract, published in the last 5 years, English. of consultation 24/05/2019.
- Puymirat, E., Geha, R., Tomescot, A., Bellamy, V., Larghero, J., Trinquart, L., Bruneval, P., Desnos, M., Hagège, A., Pucéat, M., Menasché, P., 2009. Can mesenchymal stem cells induce tolerance to cotransplanted human embryonic stem cells? *Mol. Ther.* 17, 176–182.
- Quimby, J.M., Dow, S.W., 2015. Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: A critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *The Veterinary Journal.* 204, 241–246.
- Quimby, J.M., Webb, T.L., Habenicht, L.M., Dow, S.W., 2013. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 48.
- Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martín-Burriel, I., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose

- tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 147–154.
- Ranera, B., Ordovás, L., Lyahyai, J., Bernal, M.L., Fernandes, F., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Osta, R., Cons, C., Varona, L., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet. J.* 44, 33–42.
- Rebelatto, C.K., Aguiar, A.M., Moretão, M.P., Senegaglia, A.C., Hansen, P., Barchiki, F., Oliveira, J., Martins, J., Kuligovski, C., Mansur, F., Christofis, A., Amaral, V.F., Brofman, P.S., Goldenberg, S., Nakao, L.S., Correa, A., 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* 233, 901–913.
- Remacha, A.R., Barrachina, L., Álvarez-Arguedas, S., Ranera, B., Romero, A., Vázquez, F.J., Zaragoza, P., Yañez, R., Martín-Burriel, I., Rodellar, C., 2015. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 165, 107–118.
- Requicha, J.F., Viegas, C.A., Albuquerque, C.M., Azevedo, J.M., Reis, R.L., Gomes, M.E., 2012. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev.* 8, 1211–1222.
- Romero, A., Barrachina, L., Ranera, B., Remacha, A.R., Moreno, B., de Blas, I., Sanz, A., Vázquez F.J., Vitoria, A., Junquera, C., Zaragoza, P., Rodellar, C., 2017. Comparison of autologous bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, and platelet rich plasma, for treating surgically induced lesions of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet J.* 224, 76–84.
- Rossi, D., Pianta, S., Magatti, M., Sedlmayr, P., Parolini, O., 2012. Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity. *PLoS One* 7, e46956.
- Roy, D.C., Lachance, S., Cohen, S., Delisle, J.-S., Kiss, T., Sauvageau, G., Busque, L., Ahmad, I., Bernard, L., Bambace, N., Boumédine, R.S., Guertin, M.-C., Rezvani, K., Mielke, S., Perreault, C., Roy, J., 2019. Allogeneic T-cell immunotherapy after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation without severe acute graft-versus-host disease (GVHD) in the absence of GVHD prophylaxis. *Br. J. Haematol.* 2019.
- Russell, K.A., Gibson, T.W.G., Chong, A., Co, C., Koch, T.G., 2015. Canine Platelet Lysate Is Inferior to Fetal Bovine Serum for the Isolation and Propagation of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One* 10, e0136621.
- Russell, K.A., Koch, T.G., 2016. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet. J.* 48, 261–264.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The principles of humane experimental technique. 238.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T., 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52, 2521–2529.
- Sawitza, I., Kordes, C., Götze, S., Herebian, D., Häussinger, D., 2015. Bile acids induce hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 25:13320.
- Schneider, S., Unger, M., van Griensven, M., Balmayor, E.R., 2017. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur. J. Med. Res.* 22, 17.
- Screven, R., Kenyon, E., Myers, M.J., Yancy, H.F., Skasko, M., Boxer, L., Bigley, E.C., 3rd, Borjesson, D.L., Zhu, M., 2014. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 161, 21–31.
- Semiglia, G., Filomeno, A., Yaneselli K., Díaz, H., Zunino, J., Benavides, U., Maisonnave, J., 2014. Primera aplicación terapéutica en Uruguay de células estromales mesenquimales en un canino con no-unió ósea femoral. *Veterinaria (Montevideo)*, 50, 156-164.
- Seo, J.P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N., 2013. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 95, 693–698.
- Sherman, A.B., Gilger, B.C., Berglund, A.K., Schnabel, L.V., 2017. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stem cell supernatant on equine corneal wound healing in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 120.
- Song, X., Dai, J., Li, H., Li, Y., Hao W., Zhang, Y., Zhang, Y., Su, L., Wei, H., 2019. Anti-aging effects exerted by Tetramethylpyrazine enhances self-renewal and neuronal differentiation of rat bMSCs by suppressing NF- κ B signaling. *Biosci Rep.* 25;39(6).

- Spees, J.L., Gregory, C.A., Singh, H., Tucker, H.A., Peister, A., Lynch, P.J., Hsu, S.-C., Smith, J., Prockop, D.J., 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 9, 747–756.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., Michalek, J., 2012. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells and Development*. 21, 2724–2752.
- Stute, N., Holtz, K., Bubenheim, M., Lange, C., Blake, F., Zander, A.R., 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 32, 1212–1225.
- Szabó, E., Fajka-Boja, R., Kriston-Pál, É., Hornung, Á., Makra, I., Kudlik, G., Uher, F., Katona, R.L., Monostori, É., Czibula, Á., 2015. Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells Dev.* 24, 2171–2180.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- 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.
- Toohey-Kurth, K., Sibley, S.D., Goldberg, T.L., 2017. Metagenomic assessment of adventitious viruses in commercial bovine sera. *Biologicals* 47, 64–68.
- Trzil, J.E., Masseau, I., Webb, T.L., H. Chang, C., Dodam, J.R., Cohn, L.A., Liu, H., Quimby, J.M., Dow, S.W., Reiner, C.R., 2014. Long-term evaluation of mesenchymal stem cell therapy in a feline model of chronic allergic asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 44, 1546–1557.
- Uccelli, A., Pistoia, V., Moretta, L., 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in Immunology*. 28, 219–226.
- van der Valk, J., Gstraunthaler, G., 2017. Fetal Bovine Serum (FBS) - A pain in the dish? *Altern. Lab. Anim.* 45, 329–332.
- Vangsnæss, C.T., Farr, J., Boyd, J., Dellaero, D.T., Mills, C.R., LeRoux-Williams, M., 2014. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 96, 90–98.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., van der Zanden, L., Ottenhoff, T.H.M., 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 79, 285–293.
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.* 36, 613–622.
- Vieira, N.M., Brandalise, V., Zucconi, E., Secco, M., Strauss, B.E., Zatz, M., 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 19, 279–289.
- Vogel, J.P., Szalay, K., Geiger, F., Kramer, M., Richter, W., Kasten, P., 2006. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets* 17, 462–469.
- Volk, S.W., Theoret, C., 2013. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen.* 21, 382–394.
- von Bonin, M., Stölzel, F., Goedecke, A., Richter, K., Wuschek, N., Hölig, K., Platzbecker, U., Illmer, T., Schaich, M., Schetelig, J., Kiani, A., Ordemann, R., Ehninger, G., Schmitz, M., Bornhäuser, M., 2009. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 43, 245–251.
- Wang, C., Xiao, R., Cao, Y.-L., Yin, H.-Y., 2017. Evaluation of human platelet lysate and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants for the cryopreservation of human adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491, 198–203.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5, e10088.
- Webb, T.L., Webb, C.B., 2015. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *J. Feline Med. Surg.* 17, 901–908.
- Wu, G.H., Shi, H.J., Che, M.T., Huang, M.Y., Wei, Q.S., Feng, B., Ma, Y.H., Wang, L.J., Jiang, B., Wang, Y.Q., Han, I., Ling, E.-A., Zeng, X., Zeng, Y.S., 2018. Recovery of paralyzed limb

- motor function in canine with complete spinal cord injury following implantation of MSC-derived neural network tissue. *Biomaterials* 181, 15–34.
- Xu, X., Lei, Y., Luo, J., Wang, J., Zhang, S., Yang, X.-J., Sun, M., Nuwaysir, E., Fan, G., Zhao, J., Lei, L., Zhong, Z., 2013. Prevention of β -amyloid induced toxicity in human iPS cell-derived neurons by inhibition of Cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. *Stem Cell Res.* 10, 213–227.
- Yamaguchi, M., Hirayama, F., Wakamoto, S., Fujihara, M., Murahashi, H., Sato, N., Ikebuchi, K., Sawada, K.-I., Koike, T., Kuwabara, M., Azuma, H., Ikeda, H., 2002. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 42, 921–927.
- Yaneselli K. (2015). Caracterización de las células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) extraídas de dos sitios anatómicos diferentes. Master's Thesis, FVET, Udelar, Montevideo, Uruguay.
- Yaneselli, K., Filomeno, A., Semiglia, G., Arce, C., Rial, A., Muñoz, N., Moreno, M., Erickson K., Maisonnave, J., 2013. Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Veterinary Medicine: Research & Reports*, 4, 39–44.
- Zhu, Y., Hu, H.-L., Li, P., Yang, S., Zhang, W., Ding, H., Tian, R.-H., Ning, Y., Zhang, L.-L., Guo, X.-Z., Shi, Z.-P., Li, Z., He, Z., 2012. Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Andrology*. 14, 574.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.