



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EXTRAÍDAS
DE TEJIDO ADIPOSO Y PULPA DENTAL EN FELINOS Y
EVALUACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS *IN VITRO***

AGUSTINA ALGORTA TURINI

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
2019



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EXTRAÍDAS
DE TEJIDO ADIPOSO Y PULPA DENTAL EN FELINOS Y
EVALUACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS *IN VITRO***

AGUSTINA ALGORTA TURINI

Jacqueline Maisonnave
Director de Tesis

Kevin Yaneselli
Co-director

Clementina Rodellar
Co-director

Alejandro Bielli
Co-director

2019

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Uruguaysito Benavides; DMVT, PhD

Departamento de Ciencias Microbiológicas, Área de Inmunología, Facultad de
Veterinaria
Universidad de la Republica – Uruguay

Silvia Llambí; DMVT, PhD

Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

Guillermo Grazioli; DDS, Esp

Cátedra de Materiales Dentales, Facultad de Odontología
Universidad de la República – Uruguay



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

"EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS IN VITRO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EXTRAÍDAS DE TEJIDO ADIPOSO Y PULPA DENTAL EN FELINO"

Por: Dra. Agustina ALGORTA TURINI

Directora de Tesis: Dra. Jacqueline Maisonnave
Codirectores de Tesis: Dr. Kevin Yaneselli
Dra. Clementina Rodellar
Dr. Alejandro Bielli

Tribunal

Presidente: Dr. Uruguaysito Benavides

Segundo Miembro: Dra. Silvia Llambí

Tercer Miembro: Dr. Guillermo Grazioli

Fallo del Tribunal: APROBADA CON MENCIÓN
(SSS - 12)

Anfiteatro de Anatomía
Miércoles 11 de diciembre 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)



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 11 de diciembre de 2019

Tribunal: Dr. Uruguaysito Benavides (Presidente), Dra. Silvia Llambí, Dr. Guillermo Grazioli

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.724.368-7	ALGORTA TURINI, Agustina	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Uruguaysito Benavides (Presidente)

Dra. Silvia Llambí

Dr. Guillermo Grazioli

FIRMA

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. - 6 o S.S.S. - 12



PROGRAMA DE POSGRADOS

Sres. Profesores.
Comité Académico
De Post-grado en Salud Animal.
Facultad de Veterinaria.

En nombre mío y del Tribunal consideramos que la Dra. Agustina Algorta Turini ha realizado una excelente Tesis titulada: **"OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EXTRAÍDAS DE TEJIDO ADIPOSO Y PULPA DENTAL EN FELINOS Y EVALUACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS *IN VITRO*"**

Los conocimientos generados en el trabajo de Tesis de Agustina son un gran aporte al conocimiento de la medicina regenerativa usando células madre en felinos, en Uruguay y en el mundo.

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

En animales domésticos, las más estudiadas son las células madre derivadas de tejido adiposo (TA) que han sido utilizadas en terapias en felinos. Otra fuente es la pulpa dental descrita en humanos, pero no en felinos.

En los estudios realizados en el mundo, en felinos, se caracterizó y criopreservó células madre derivadas de tejido adiposo (AD-MSCs), lo cual ha sido hasta el momento una fuente alternativa de células madre con características diferenciales por su origen embrionario particular.

En la presente tesis Agustina aisló y evaluó las características "*in vitro*" y estabilidad citogenética de dos fuentes de células madre (CM) felinas: las derivadas de tejido adiposo (CMM TA) y de pulpa dental (CMPD). Evaluó la multipotencia la tridiferenciación *in vitro* (osteogénica, adipogénica y condrogénica), así como su capacidad clonogénica y de proliferación mediante tiempo de doblaje en sucesivos pasajes.

Además, la mencionada estudiante realizó estudios citogenéticos *in vitro*, de ambas fuentes, en busca de posibles alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales que puedan comprometer su utilización terapéutica *in vivo*. Ella logró el aislamiento exitoso de muestras de tejido adiposo (CMM TA) así como de pulpa dental, (CMPD).

Este es el primer reporte en el mundo de aislamiento de CMPD felinas y el primer estudio de estabilidad morfológica, de clonaje y estabilidad genética *in vitro* de ambas fuentes de CM felinas en sucesivos pasajes, todo lo cual indica el gran aporte al conocimiento de la medicina regenerativa en los felinos desarrollada por la Dra. Agustina Algorta.

Sin más lo saluda atentamente.

Uruguaysito Benavides. DMTV, PhD
Presidente del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional y por incentivar-me a superarme cada día. Especialmente a la Dra. Gabriela Turini por su rol de madre, de profesional referente y ser el impulso y respaldo en tantas cosas.

A mi orientadora, la Dra. Jacqueline Maisonnave, por permitirme acercarme y ser parte de la medicina regenerativa veterinaria, por el tiempo dedicado, la paciencia y la confianza depositada en mí durante estos años.

A mis co-orientadores, el Dr. Kevin Yaneselli, compañero de cátedra y de oficina, por el tiempo dedicado y la confianza; la Dra. Clementina Rodellar por integrarme como una más de su equipo; al Dr. Alejandro Bielli por aceptar ser parte de este camino.

Al área de Genética de FVet por abrirme las puertas durante estos años y muy especialmente al Dr. Rody Artigas por introducirme y guiarme en el mundo de la citogenética, por sus aportes siempre positivos y su paciencia.

A todo el Dpto. de Ciencias Microbiológicas y al área de Inmunología, particularmente al Dr. Uruguaysito Benavides por entenderme y apoyarme siempre.

Al Laboratorio de Genética Bioquímica de la Universidad de Zaragoza y el equipo de la Dra. Rodellar por recibirme afectuosamente y por todo ese tiempo dedicado a mi formación.

A los Dres. Guillermo Grazioli y Alejandro Francia por ser claves en el inicio de la línea de CMPD.

Al Centro Hospital Veterinario de FVet, a la Dra. Cigliutti, la Dra. Rorher, la Veterinaria Avisena, la Dra. Aniano, la Br. Tejera y todos aquellos que me facilitaron muestras de felinos y de alguna manera estuvieron relacionados e hicieron posible este proyecto.

A la ANII por otorgarme la beca de maestría, a INIA por el premio de excelencia académica que me permitió viajar a Zaragoza, a CIDEA por la financiación de parte de este proyecto.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	3
2.1 CELULAS MADRE.....	3
2.1.1. Células madre mesenquimales	4
2.1.2. Criterios mínimos para definir una CMM.....	4
2.1.3. Propiedades de interés terapéutico.....	5
2.1.4. Terapias con CMM en felinos	6
2.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO	7
2.2.1. Estructura del tejido adiposo	7
2.2.2. Características de las CMM TA	7
2.3. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDOS DENTALES	8
2.3.1. Estructura dental	8
2.3.2. Aspectos relevantes de la embriología dental	9
2.3.3. Características de las CMPD	9
2.3.4. Potencial regenerativo de interés terapéutico de las CMPD	11
2.4. ESTABILIDAD CITOGENÉTICA DE LAS CM <i>in vitro</i>	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
3.1. HIPÓTESIS	14
3.2. OBJETIVO GENERAL	14
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1. Diseños experimentales.....	15
4.2. Obtención de muestras:.....	15
4.3. Serología de VIF y ViLeF de los animales donantes de tejido adiposo	16
4.4. Aislamiento y cultivo de CMM-TA.....	16
4.5. Obtención de pulpa dental, aislamiento y cultivo de CMPD	16
4.6. Caracterización de las CMM TA y CMPD felinas.....	17
4.7. Evaluación de estabilidad citogenética	18
4.8. Análisis estadístico	19
5. RESULTADOS	21

5.1.	Donantes y muestras	21
5.2.	Aislamiento, expansión y morfología celular.....	21
5.3.	Proliferación celular.....	26
5.4.	Tridiferenciación <i>in vitro</i>	30
5.5.	Evaluación citogenética.	32
6.	DISCUSIÓN.....	37
7.	CONCLUSIONES	45
8.	PERSPECTIVAS.....	46
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
10.	ANEXOS	61

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Resultados de ensayo de capacidad clonogénica para las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Cuadro II. Ensayo de capacidad clonogénica para las células madre derivadas de pulpa dental.

Cuadro III. Número de alteraciones detectadas según tipo y valores de p para células madre mesenquimales de tejido adiposo en los pasajes 2 y 4.

Cuadro IV. Número de alteraciones detectadas según tipo para células madre de pulpa dental en los pasajes 2 y 4.

Figura 1. Imagen microscópica de células madre derivadas de pulpa dental y tejido adiposo (4×).

Figura 2. Alteraciones de crecimiento en pasajes tempranos observadas en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (4×)

Figura 3. Imágenes microscópicas (20× y 40×) de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo del individuo G10 en los pasajes celulares 2, 4 y 6 teñidas con Giemsa.

Figura 4. Alteraciones morfológicas observadas durante el cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en pasaje 4 y pasaje 6.

Figura 5. Imágenes microscópicas (20×) de células madre de pulpa dental felina en pasaje 2 (A), pasaje 4 (B) teñido con Giemsa y pasaje 6 (C) teñido con verde luz.

Figura 6. Relación núcleo/citoplasma entre diferentes pasajes de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Figura 7. Ensayo de unidades formadoras de colonias para células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y células madre de pulpa dental en pasajes 2, 4 y 6.

Figura 8. Unidades Formadoras de Colonias de Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (A) y derivadas de pulpa dental (B) felinas en distintos pasajes.

Figura 9. Tiempo de doblaje en diferentes pasajes.

Figura 10. Tridiferenciación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo felina en pasaje 2.

Figura 11. Tridiferenciación de células madre de pulpa dental felina en pasaje 2.

Figura 12. Tiempo en días de cultivo hasta diferenciación osteogénica y condrogénica.

Figura 13. Cariotipo normal $2n=38, XX$ (hembra) con Bando Q de células madre mesenquimales de tejido adiposo felino.

Figura 14. Principales alteraciones cromosómicas estructurales encontradas en cultivos de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y pulpa dental.

Figura 15. Imágenes microscópicas a 100× de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Figura 16. Número de metafases de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo con y sin alteraciones cromosómicas en pasaje 2 y 4.

Figura 17. Propuesta de cariotipo normal ($2n=38, XX$) teñido con Giemsa de células madre de pulpa dental felina de un felino hembra.

Figura 18. Metafases de células madre de pulpa dental (CMPD).

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) han sido el foco de interés en los últimos años desde el punto de vista terapéutico por presentar características únicas como autorenovación, multipotencialidad, migración al foco inflamatorio, inmunomodulación y angiogénesis. En especies domésticas, las más estudiadas son las células madre derivadas de tejido adiposo (TA) que han sido utilizadas en terapias en felinos. Otra fuente es la pulpa dental descrita en humanos, pero no en felinos, lo cual representa una fuente alternativa de células madre con características diferenciales por su origen embrionario particular. El objetivo del presente trabajo fue estudiar y evaluar las características *in vitro* y estabilidad citogenética de dos fuentes de células madre (CM) felinas: las derivadas de tejido adiposo (CMM TA) y de pulpa dental (CMPD). Para ello se estudiaron 13 cultivos de CMM TA aisladas por método enzimático y 2 cultivos de CMPD aisladas por método de explante. Se evaluó su morfología *in vitro* mediante tinción Giemsa, en pasajes 2, 4 y 6. Se estudió su capacidad clonogénica mediante test de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas y su proliferación mediante tiempo de doblaje en pasajes 2, 4 y 6. Se evaluó la multipotencia la tridiferenciación *in vitro* (osteogénica, adipogénica y condrogénica). Se realizaron estudios citogenéticos en estos sucesivos pasajes celulares *in vitro*, de ambas fuentes, en busca de posibles alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales que puedan comprometer su utilización terapéutica *in vivo*. Se logró el aislamiento exitoso de 19 muestras de grasa y 2 muestras de pulpa dental. Las CMM TA presentaron una morfología fusiforme mientras que las CMPD presentaron una población con células fusiformes y epitelioides. La relación núcleo citoplasma fue menor para las CMPD. Ambas fuentes manifestaron una buena capacidad clonogénica. El tiempo de doblaje para las CMM TA fue de 2,52 días en pasaje 2, de 9,41 en pasaje 4 y de 10,55 en pasaje 6, mientras que para las CMPD fue de 2,48 y 5,11 días en pasaje 2, de 7,61 y 12,28 en pasaje 4; de 7,61 y 10,24 en pasaje 6. Se observaron alteraciones nucleares como cariorrexis y cariólisis en pasaje 4 de CMM TA, que a su vez coincidió con un aumento en el tiempo de doblaje y una caída del índice mitótico de estas células, disminuyendo su crecimiento a partir de este pasaje. Ambas fuentes fueron capaces de diferenciar al trilineaje. Se analizaron 266 metafases en pasaje 2 de CMM TA y 47 en pasaje 4, observándose mayormente cariotipos normales aunque se evidenciaron signos de inestabilidad estructural como gaps, fracturas, deleciones, duplicaciones y separaciones tempranas de cromátida. Se analizaron 19 metafases en pasaje 2 de CMPD y 47 en pasaje 4, observándose un patrón de alteraciones similar a las CMM TA. Este es el primer reporte de aislamiento de CMPD felinas y el primer estudio de estabilidad *in vitro* de ambas fuentes de CM felinas en sucesivos pasajes.

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSC) have been target of interest during the last years from a therapy perspective due to their unique characteristics of self-renewal, multipotency, “homing” capacity, immunomodulation and angiogenesis. In domestic animals, the most studied type of MSC are those derived from adipose tissue (AT) and have been used for therapy in felines. Another source is the dental pulp, described in humans but not in felines, which represents an alternative source of stem cells with different characteristics due to their particular embryologic origin. The objective of this research was to assess the *in vitro* characteristics and cytogenetic stability of two sources of feline MSC: those derived from adipose tissue (AT-MSC) and those from dental pulp (DPSC). For this purpose we studied 13 cultures of AT-MSC isolated by enzymatic method and 2 cultures of DPSC isolated by overgrowth method. Morphology was assessed by Giemsa staining at passages 2, 4 and 6. Clonogenic capacity was assessed by Colony Forming Units Fibroblast (CFU-F) test and their proliferation by doubling time at passages 2, 4 and 6. Multipotency was assessed by trilineage differentiation (osteogenic, adipogenic and chondrogenic). Cytogenetic studies on these passages were made. We isolated successfully MSC from 19 adipose tissue samples and 2 dental pulp samples. The AT-MSC showed a spindle shaped morphology while DPSC showed spindle shaped and epithelial-like cells. The nucleus – cytoplasm ratio was lower for DPSC. The doubling time for AT-MSC was 2.52 days in passage 2, 9.41 in passage 4 and 10.55 in passage 6 while for DPSC was 2.48 and 5.11 days in passage 2, 7.61 12.28 in passage 4 y 7.61 and 10.24 in passage 6. We observed nuclear abnormalities such as karyorrhexis and karyolysis in passage 4 of AT-MSC, which coincides with an increase of doubling time and decrease on mitotic index of these cells showing a decreased growth kinetic after P₄. Both sources were able to tridifferentiate. We analysed 266 metaphases in passage 2 and 4 in passage 4 from AT-MSC observing mainly normal karyotypes but some structural instability signals were observed such as gaps, breaks, deletions, duplications and early chromatid segregation. For DPSC, 19 metaphases were analysed at passage 2, and 47 at passage 4, observing abnormalities similar to AT-MSC. This is the first report of feline DPSCs isolation and the first study on *in vitro* stability of feline MSC in several passages.

1. INTRODUCCIÓN

Sin duda las células madre mesenquimales (CMM) han llamado la atención tanto de investigadores como clínicos veterinarios de todo el mundo en la última década. Estas células se encuentran en todos los órganos del individuo adulto y son capaces de mantenerse indiferenciadas a lo largo del tiempo, de autorrenovarse y de dividirse asimétricamente manteniendo su propio *pool* o diferenciándose a una célula especializada según el tejido donde se encuentra (Fortier., 2005; Pittenger et al., 1999). Algunas de sus características han resultado atractivas para utilizarlas de forma terapéutica como su multipotencialidad, inmunomodulación, angiogénesis, migración al foco inflamatorio (*homing*) y poder antimicrobiano (Yaneselli., 2015). Hoy en día la terapia con células madre es una realidad en medicina humana como veterinaria. Existen más de 7000 ensayos clínicos con células madre (clinicaltrials.gov) en humanos. Actualmente se realizan a nivel internacional, terapias con CMM en animales domésticos, principalmente en caninos, equinos y felinos e incluso se ha generado un mercado de estos productos biológicos destinados a animales existiendo a nivel mundial empresas dedicadas a su producción.

El desarrollo de la terapia celular ha permitido evaluar su aplicación en especies domésticas y animales de compañía (Hoffman & Dow, 2016). En este aspecto, el felino como paciente veterinario presenta patologías crónicas y de pronóstico reservado en las cuales se ha planteado el uso de CMM como tratamiento alternativo, cuando la terapia convencional no da resultados. Comúnmente, las CMM derivadas de tejido adiposo son las más utilizadas para terapia celular debido a su facilidad de obtención, mínimo discomfort para el paciente y rápida proliferación (Quimby & Borjesson., 2018).

En felinos existen reportes a nivel internacional de uso de CMM para enfermedad renal crónica (Quimby & Dow, 2015; Quimby et al., 2013; Quimby et al., 2015), fracturas óseas (Gardel et al., 2010), asma (Trzil et al., 2014), enteropatía crónica (Webb & Webb., 2014), gingivoestomatitis crónica (Arzi et al., 2017), queratitis eosinofílica (Villatoro et al., 2018). Algunas de estas patologías que el felino presenta de forma natural, son similares a las que presenta el humano. Además se ha visto que las características de comportamiento *in vitro* de las CMM derivadas de tejido adiposo (CMM TA) felinas y humanas así como sus características fenotípicas y propiedades inmunomoduladoras son similares entre sí (Clark et al., 2017). Por lo tanto, el avance en el estudio de las características y comportamiento de las CMM de esta especie, favorece al conocimiento y la terapia regenerativa tanto en felinos como en humanos.

La primera fuente de CMM descrita en felinos fue la médula ósea (Martin et al., 2002). Las siguientes fuentes descritas fueron el tejido adiposo (Quimby et al., 2011), membrana amniótica (Rutigliano et al., 2013), cordón umbilical (Brólio et al., 2012), espermatogonias (Powell et al., 2016), sangre periférica (Sato et al., 2016). Aunque tienen comportamientos y características en común, las células derivadas de distintas fuentes, presentan fenotipos diferentes que pueden reflejar propiedades funcionales diferentes (Devireddy et al., 2017).

Por otro lado, la obtención de cantidades suficientes de CMM para una terapia, implica el cultivo y expansión *in vitro* de estas células. La exposición prolongada de las células al estrés de la proliferación *in vitro* puede producir mutaciones y aberraciones cromosómicas a lo largo de los sucesivos pasajes (Borgonovo et al. 2014; Pan et al. 2014; Wang et al. 2012). Sin embargo, este es un punto muy controversial y sobre el cual aún existe incertidumbre (Neri, 2019). Diversos trabajos en humanos han revelado que las CMM-TA *in vitro* presentarían una alta estabilidad citogenética (Bernardo et al., 2007), sin embargo existen reportes de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Cornélio et al. 2014; Borgonovo et al., 2014) aunque algunos de ellos se han retractado (de la Fuente et al. 2010).

Basado en la cantidad de publicaciones indexadas en la plataforma *pubmed*, se observa claramente que el número de publicaciones en la especie felina es muy reducido comparada a otras especies domésticas. Encontramos 73 publicaciones bajo el motor de búsqueda “*feline mesenchymal stem cells*” y la mayoría son recientes. Pero si cambiamos la especie, encontramos 551 publicaciones para equinos y 819 para caninos. Si comparamos con humano y murinos encontramos 40.760 y 22.705 publicaciones respectivamente.

El conocimiento de las características *in vitro* de las CMM de diferentes fuentes es fundamental para la planificación de terapias celulares eficaces y seguras. En el presente trabajo se estudiaron las características de proliferación, diferenciación y estabilidad citogenética durante el cultivo de 2 fuentes de CMM en felinos, las CMM TA y una nueva fuente no descrita hasta el momento para esta especie, las células madre de pulpa dental.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 CÉLULAS MADRE

Desde el descubrimiento de las células madre (CM) en todos los tejidos animales y su papel central en el mantenimiento de la homeostasis y reparación natural de los tejidos, la investigación biomédica ha dirigido su foco de atención hacia su potencial terapéutico.

Las CM son células indiferenciadas, capaces de autorrenovarse por un período largo de tiempo manteniéndose indiferenciadas y son capaces de diferenciarse en un tipo de célula especializada de un tejido en particular (Fortier., 2005; Pittenger et al., 1999). En otras palabras, las CM son capaces de presentar divisiones simétricas, pudiendo dar origen a células indiferenciadas reponiendo el *pool* de CM, y asimétricas diferenciándose en células progenitoras especializadas. Pueden clasificarse según el tejido de origen del que son extraídas: células madre embrionarias (CME) o adultas (CMA) y también según su potencialidad de diferenciación, pudiendo clasificarse en células totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Fortier., 2005; Takahashi & Yamanaka., 2006).

Las células totipotentes son capaces de crear un organismo completo, diferenciándose hacia las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) y formar los anexos embrionarios. Esta propiedad se manifiesta en el cigoto hasta la etapa de mórula.

Las células pluripotentes son capaces de formar tejidos de las tres capas germinales embrionarias. Estas células se encuentran naturalmente en la masa celular interna del blastocisto por un corto periodo de tiempo en el embrión hasta que este se diferencia a células multipotentes especializadas (Biehl & Russell, 2009). Sin embargo, Takahashi y Yamanaka (2006) consiguieron generar células pluripotentes a partir de reprogramación de células adultas las cuales se denominaron células madre pluripotenciales inducidas (*iPS – induced pluripotent stem cells*). Esta reprogramación de células adultas fue realizada mediante la introducción de 4 factores de transcripción embrionarios, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, técnica descrita por Takahashi y Yamanaka (2006).

Las células multipotentes tienen una diferenciación restringida a algunos linajes derivados de la misma línea germinal. Las células madre multipotentes con el mayor potencial de diferenciación se encuentran en el embrión en desarrollo, durante la gastrulación.

En el espectro más bajo de diferenciación se encuentran las células unipotentes que pueden diferenciarse únicamente en un tipo celular especializado. Estas células suelen encontrarse en órganos y a pesar de su capacidad de diferenciación restringida, esos progenitores limitados juegan un rol importante en el mantenimiento de la integridad tisular reemplazando células envejecidas o dañadas.

Comúnmente pueden clasificarse de forma amplia en “embrionarias” o “adultas” dependiendo de la etapa de desarrollo del individuo de la que son obtenidas. Las CME son células totipotentes o pluripotentes obtenidas del embrión antes de su implantación en el útero, principalmente de la masa celular interna del blastocisto. Las CMA engloba células multipotentes que proceden de los órganos o tejidos de un individuo luego del nacimiento. Sin embargo, dados los problemas de generación de teratomas al ser transparentadas y los problemas éticos que plantean la utilización de CME (Biehl & Russell, 2009; Fortier, 2005), nos centramos en las células madre adultas.

2.1.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM) conocidas en la literatura internacional como MSCs (*mesenchymal stem cells*) presentan características generales de las células madre adultas, es decir limitada capacidad de autorrenovación *in vitro* y multipotencialidad (Bourin et al., 2013). Derivan de la capa embrionaria del mesodermo por lo que van a ser capaces de diferenciarse en células que conforman tejidos de esta misma capa como hueso, cartílago, musculo, tendones, ligamento, grasa y otros tejidos conectivos. Sin embargo, la capacidad de diferenciación de estas células no parece limitarse solo a estos tejidos ya que también se ha descrito su diferenciación a tejido neurogénico (Bronzi et al., 2010), células pancreáticas (Karnieli et al., 2007) o hepáticas (Ishikawa et al., 2010) bajo estímulos específicos. Su capacidad de autorrenovación es limitada por lo que acaban por detener su crecimiento tras largos períodos de cultivo *in vitro* (Książek., 2009). Estas células pueden aislarse de todo tejido adulto como medula ósea, pulmón, hígado, vasos sanguíneos, timo, musculo, cerebro (da Silva Mierelles et al., 2006). Se ha visto que las CMM tienen una gran similitud con los pericitos que se encuentran en la membrana basal vascular y se ha sugerido que esta podría ser su ubicación justificando su presencia en todos los órganos (da Silva Meirelles et al., 2006).

La primera fuente de CMM descrita fue la médula ósea (MO) por Friedenstein et al. (1970). Estas se obtienen puncionando la cresta ilíaca, tibia, fémur, columna vertebral y esternón en humanos y grandes mamíferos. En 2001, Zuk et al., describe por primera vez el tejido adiposo (TA) como fuente de CMM a partir de lipoaspirados en humanos. Otra fuente interesante de CMM es la pulpa dental, descrita por primera vez en el 2000 por Gronthos et al., a partir de terceros molares impactados en humanos, o dientes deciduos (Miura et al., 2003), es decir que un producto de habitual descarte es fuente de CMM. Estas células han sido objeto de estudio para tratamientos regenerativos odontológicos y óseos debido a su gran capacidad de diferenciación odonto y osteogénica. Aunque las CMM comparten características y comportamientos, las células derivadas de distintas fuentes presentan fenotipos diferentes, que pueden reflejar propiedades funcionales diferentes (Devireddy et al., 2017; Bianco et al., 2008). Por ejemplo, las CMM de medula ósea son más predispuestas a la diferenciación en osteoblastos, mientras que las de grasa tienden a formar adipocitos (Bianco et al. 2008) y las de pulpa dental son más odontogénicas (Huang et al. 2009).

Para la especie felina, la primera fuente descrita también fue la medula ósea (Martin et al. 2002). Luego se describieron la CMM derivadas de tejido adiposo (Quimby et al, 2011), membrana amniótica (Rutigliano et al., 2013), cordón umbilical (Brólio et al., 2012), espermatogonias (Powell et al. 2016) y sangre periférica (Sato et a., 2016).

2.1.2. Criterios mínimos para definir una CMM

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society of Cell Therapy – ISCT*) ha definido algunos parámetros mínimos para la identificación de CMM humanas (Dominici et al. 2009). Las CMM al ser mantenidas en condiciones de cultivo, deben ser adherentes al plástico. Más del 95% de la población aislada debe expresar determinados marcadores de

superficie: CD105, CD73, CD90 determinado por citometría de flujo. Por el contrario, estas células deben expresar menos de 2% de los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 alfa o CD19 y MHC II. Además, deben poder diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*. La diferenciación a osteoblastos puede ser demostrada por las tinciones Alizarin Red o Von Kossa, los adipocitos pueden demostrarse por la tinción Oil Red O y los condroblastos mediante tinción Alcian Blue o tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo II. Se sugiere verificar que las células presenten un cariotipo normal, pero no se utiliza rutinariamente. Sin embargo, estos criterios se aplican únicamente para CMM humanas. Si bien la adherencia al plástico y diferenciación al trilineaje también son características de CMM de otras especies, los marcadores de superficie no están bien definidos en especies de interés veterinario (Dominici et al. 2009). Por lo general, los anticuerpos diseñados de forma específica para especies domésticas son escasos o no está definida la reactividad cruzada de anticuerpos humanos contra especies domésticas (Devireddy et al, 2017).

2.1.3. Propiedades de interés terapéutico

Las CMM exhiben un gran tropismo por tejidos lesionados denominado “*homing*” y rápidamente promueven la regeneración (Weiss & Troyer, 2006; Karp & Leng Teo, 2009). Son atraídas por factores quimiotácticos al sitio de lesión o foco inflamatorio donde se liberan factores como: SDF1-*stromal cell-derived factor-1* (Abbott et al., 2004), PDGF-*platelet-derived growth factor*, IGF-1-*insuline-like growth factor 1*, IL8 y TNF α -*tumor necrosis factor alpha* (Khosrotehrani, 2013; Nakamizo et al., 2005).

Actualmente, se sabe que su potencial terapéutico está dado en gran parte a la capacidad de modular la regeneración tisular y el sistema inmune a través de moléculas bioactivas como citoquinas antiinflamatorias, moléculas tróficas y antiapoptóticas e interacción célula-célula y no tanto por su capacidad de diferenciarse en tejido adulto y reemplazar el lesionado (Caplan, 2017). También contribuyen a la regeneración mediante la liberación exosomas y microvesículas que contienen estos factores (Phinney & Pittenger, 2017). Tienen propiedades inmunomoduladoras pudiendo inhibir la proliferación linfocitaria *in vitro* lo cual se ha comprobado en varias especies y además disminuyen la producción de linfocitos T CD4 y CD8, polarizan la respuesta a un fenotipo Th2 e inhiben la diferenciación y función de los Th17 (Carrade & Borjesson., 2013). Anteriormente se describió a las CMM como “inmunoprivilegiadas” porque no eran rechazadas en implantes alogénicos o xenogénicos por parte del huésped. Sin embargo, se describieron reacciones inmunológicas de rechazo a las CMM alogénicas, que implicaban el alorreconocimiento de los MHC tipo I y II y hallando linfocitos alorreactivos de memoria en los pacientes receptores de la terapia (Badillo et al., 2007). Por lo tanto, se reemplazó el concepto de inmunoprivilegiadas por el de “inmuno-evasivas” ya que son reconocidas por el sistema inmune del huésped, pero no generan una respuesta de rechazo intensa como ocurre en los trasplantes de tejidos u órganos (Ankrum & Karp., 2014; Waterman et al., 2010).

También promueven neovascularización a través de la liberación de moléculas bioactivas con efecto local, como *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor*

(FGF-2), *angiopoietin-1* (Ang-1), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), IL6 (Boomsma & Geenen., 2012; Chen et al., 2008; Hung et al., 2007; Wu et al., 2007).

2.1.4. Terapias con CMM en felinos

El felino como paciente veterinario presenta patologías crónicas y de pronóstico reservado en las cuales se ha planteado el uso de CMM como tratamiento alternativo, cuando la terapia convencional no da resultados. Las más utilizadas en esta especie son las CMM TA (Quimby and Bojerson 2018). Encontramos estudios a nivel internacional de utilización de CMM en la enfermedad renal que representa una patología frecuente en felinos. Estos estudios realizaron aplicaciones de CMM TA intrarrenales (Quimby et al., 2011) como intravenosas (Quimby et al, 2013; Quimby and Dow, 2015; Quimby et al., 2015). Utilizaron dosis de entre 2 a 4 $\times 10^6$ de células de forma alogénica, mostrando la seguridad del uso de CMM TA alogénicas frescas y los efectos adversos inherentes al uso de CMM TA criopreservadas sin expandir, previo a la aplicación (Quimby et al, 2013). Se han aplicado CMM derivadas de membrana amniótica intrarrenales como intravenosas, a dosis de 2×10^6 /kg de peso, con buenos resultados (Vidane et al., 2014). Sin embargo fueron mejores los resultados de la terapia endovenosa dado que la aplicación intrarrenal presentó complicaciones de implementación como sedación del paciente, anestesia, hemorragia y estrés. Estas células tienen un efecto renoprotector y mejora la función renal en gatos con enfermedad renal crónica natural y estabiliza la condición clínica y la progresión de la enfermedad. También existen en la misma especie reportes de utilización de CMM derivadas de médula ósea en fracturas óseas obteniendo muy buena consolidación (Gardel et al. 2010). La aplicación de CMM TA en dosis de 2×10^6 células/kg de peso por vía intravenosa y separada 1 a 2 semanas en gatos con enteropatía crónica, mostró resultados alentadores (Webb and Webb. 2014). El asma felino crónico (Trzil et al. 2014) y agudo (Trzil et al., 2016) también ha sido objeto de estudio dada la capacidad de inmunomodulación que las CMM poseen como potencial alternativa terapéutica y se observó disminución del grosor bronquial por tomografía computarizada en los felinos tratados. Estos estudios utilizaron dosis de 3,6 a 25×10^6 células por gato intravenosas alogénicas para asma crónico y 2 a 10×10^6 de células por gato por vía intravenosa para asma agudo. Otra enfermedad muy dolorosa para el felino y de tratamiento frustrante para el clínico veterinario es la gingivoestomatitis crónica felina. Esta es una enfermedad inflamatoria crónica inmunomediada de la mucosa oral, que resulta de una respuesta aberrante y desregulada del sistema inmune. Dadas las características inmunomoduladoras de las CMM, se obtuvieron resultados muy alentadores al aplicar CMM TA intravenosas en felinos que padecían gingivoestomatitis crónica refractaria tanto de forma autóloga (Arzi et al., 2016) como alogénica (Arzi et al., 2017). Utilizaron 2 inyecciones intravenosas de 20×10^6 células separadas 3 a 4 semanas y obtuvieron remisión parcial y total de la sintomatología, con un seguimiento de los casos de 22 meses. Existen reportes de utilización de CMM TA felinas para queratitis eosinofílica felina (Villatoro et al. 2018) por vía subconjuntival aplicando una dosis de 2×10^6 CMM TA alogénicas y obteniendo remisión de la sintomatología, con un seguimiento de hasta 11 meses.

Algunas de estas patologías que el felino presenta de forma natural son similares a las que presenta el humano como: la enfermedad inflamatoria intestinal análoga a la enfermedad de Crohn, el asma, la gingivoestomatitis crónica felina, similar al liquen plano oral humano, la insuficiencia renal tanto aguda como crónica. El felino como paciente puede significar un modelo interesante, ya que las patologías que ocurren de forma natural, representan de forma más real la complejidad genética, ambiental y variabilidad fisiológica que un modelo experimental inducido. Además, las características de comportamiento *in vitro* de las CMM TA felinas y humanas, así como sus características fenotípicas y propiedades inmunomoduladoras son similares entre sí (Clark et al. 2017). Por lo tanto, es necesario avanzar en el estudio de la biología celular de esta especie, como posible modelo de estudio de la terapia regenerativa tanto en felinos como en humanos.

2.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO

2.2.1. Estructura del tejido adiposo

El TA blanco o unilocular contiene una única gota lipídica y representa la mayoría de tejido en adultos. El TA unilocular se comienza a formar en las primeras semanas de vida fetal, a partir de las CMM que rodean pequeñas vénulas y comienzan a diferenciarse en adipoblastos y luego en preadipocitos. Los mismos se transforman en adipocitos inmaduros, cuando presentan toda la maquinaria necesaria para sintetizar y degradar triacilglicérols. Los adipocitos acumulan progresivamente gotas de lípidos, por lo que el núcleo adopta una posición más excéntrica. Finalmente, se llega a la etapa de adipocito maduro formando la gran gota lipídica y no poseen más la capacidad de dividirse por mitosis (Bruel et al. 2014). La fuente más elegida para terapia con CMM tanto en humanos como en animales, es el tejido adiposo ya que tiene ciertas ventajas sobre las de médula ósea como, mayor cantidad de CMM y elevada capacidad de proliferación (Baglioni et al., 2012; Oberbauer et al., 2015; Zuk et al., 2002), el método de extracción causa menos discomfort (Kern et al., 2006; Strem et al., 2005) y perdura su estado de indiferenciación por un número mayor de pasajes (da Silva Meirelles et al., 2009; Rebelatto et al., 2008; Zuk et al., 2001). Las CMM TA son extraídas de la fracción vascular estromal (*stromal vascular fraction - SVF*) mediante digestión enzimática del TA. Esta fracción consiste en una población heterogénea de células mesenquimales, que no solo incluye células madre mesenquimales adiposas, hematopoyéticas y precursores celulares, sino también células endoteliales, eritrocitos, fibroblastos, leucocitos y pericitos entre otros (Bourin et al., 2013). Cuando se siembra la SVF se adhieren al plástico las CMM y se purifica esta población mediante expansión durante el cultivo celular (Bourin et al., 2013).

2.2.2. Características de las CMM TA

Las CMM TA felinas presentan adherencia al plástico, tienen una morfología fibroblástica en cultivo y expresan CD44, CD105 y CD90 (Quimby et al., 2011; Kim et al., 2016). No

expresan antígenos leucocitarios (CD4, CD18), MHC II (Quimby and Borjesson. 2018), CD14, CD34, CD45 (Kim et al., 2016). Las CMM TA felinas son negativas a CD73 (Gómez et al., 2015; Kim et al., 2016), aunque se ha sugerido que la falta de expresión de este marcador en CMM aisladas de membranas fetales de gato (Rutigliano et al., 2013) y linfocitos circulantes de gato, puede explicarse por la falta de reacción cruzada de los anticuerpos de humano con los epítopes correspondientes en felinos (Iacono et al., 2012). Esto resalta las potenciales diferencias y dificultad de caracterización mediante inmunofenotipo de las CMM en esta especie. Se ha demostrado la capacidad de multipotencia de estas células mediante diferenciación *in vitro* a linajes mesodérmicos como osteogénico, condrogénico, adipogénico (Kim et al., 2016) y ectodérmico como neurogénico (Gómez et al., 2015).

Una de las características de las CMM TA que más interés ha generado para su uso terapéutico en felinos es su capacidad inmunomoduladora. Se ha visto que las CMM TA felinas son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T activados *in vitro* (Arzi et al., 2016; Clark et al., 2017; Parys et al., 2017; Zajic et al., 2017) y secretar una variedad de mediadores capaz de modular la función de células del sistema inmune. Las CMM TA tanto de gato como de humano secretan bajas concentraciones de indolamina 2, 3 – dioxigenasa (IDO), prostaglandina E2 (PGE₂), IL6, VEGF, IL8 y TGF-β en condiciones basales, pero cuando son cocultivadas con linfocitos T activados, las CMM TA secretan altas cantidades de estos mediadores (Clark et al., 2016; Parys et al., 2017). Las CMM TA felinas lograron inhibir la producción de TNF alfa de forma más notoria que la de INF gamma comparado con las CMM TA humanas. Asimismo demostró que las CMM TA felinas aumentaron la secreción de IL10 por parte de las células mononucleares de sangre periférica (Clark et al. 2017). También se ha visto que las CMM o incluso su sobrenadante pueden reducir la producción de intermediarios reactivos de oxígeno de los neutrófilos (Mumaw et al., 2015).

2.3. CÉLULAS MADRE DERVIADAS DE TEJIDOS DENTALES

2.3.1. Estructura dental

El diente está dividido en 2 grandes regiones anatómicas: la corona y la raíz. La corona está cubierta por esmalte y la raíz por cemento. Internamente está formado por la dentina y la pulpa dental. Brevemente (Gorrel et al., 2006): El esmalte es el tejido más mineralizado del organismo. No tiene inervación ni vascularización. El 96% es contenido inorgánico formado por cristales de hidroxiapatita cálcica. La dentina está compuesta por 70% de material inorgánico, 18% de material orgánico y 12% de agua. Es producida por los odontoblastos ubicados en la pulpa dental durante toda la vida del individuo. La dentina primaria es la primera capa que se forma, luego se da un depósito de dentina lento y fisiológico que se denomina dentina secundaria y por ultimo frente a traumas o injurias, se deposita dentina rápidamente, pero menos ordenada que las anteriores y se denomina dentina terciaria o reparadora (Gorrel et al., 2006). La pulpa dental es un tejido conectivo rico en colágeno, que contiene vasos sanguíneos, linfático, nervios mielinizados y no mielinizados, fibroblastos y células mesenquimales indiferenciadas y está delimitada por los odontoblastos, células

especializadas que sintetizan la dentina. También posee macrófagos, células dendríticas y linfocitos responsables de las respuestas inmunes de la pulpa. Las principales funciones de la pulpa dental son la de formación de dentina, nutrición, defensa y sensorial (Emily., 1998). El diente está sujeto por el periodonto, que se compone del cemento, ligamento periodontal, hueso alveolar y encía marginal (Gorrel et al., 2006).

2.3.2. Aspectos relevantes de la embriología dental

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, a medida que el tubo neural se forma, un grupo de células se separa del neuroectodermo y son capaces de migrar fuera de su epitelio parental para agregarse a otras células. Ellas son base para la formación de estructuras tales como los ganglios espinales, nervios autónomos, sensitivos, células de Schwann, melanocitos, esqueleto cráneo facial, cornea, glándula tiroides, septos cardiacos, glándulas adrenales, dientes y la mayoría de los tejidos de la cabeza (Yildirim., 2013). A pesar de que las células de la cresta neural son de origen ectodérmico, sufren una transformación epiteliomesenquimal, cambiando sus propiedades de organización de citoesqueleto y propiedades de adhesión celular permitiéndoles migrar. El tejido conjuntivo embrionario de cualquier parte del cuerpo deriva del mesodermo intraembrionario conocido como mesénquima, mientras que en la cabeza a este se le conoce como ectomesenquima, reflejando su origen a partir del neuroectodermo. Todos los tejidos dentales (excepto el esmalte y parte del cemento) y su aparato de sostén son derivados directamente de la cresta neural (Nanci., 2013). Una invaginación epitelial sobre una masa esférica de ectomesenquima condensado da lugar al llamado órgano del esmalte, ya que será el encargado de formar el esmalte. La masa esférica de células ectomesenquimales condensadas se denomina papila dentaria y formará la dentina y la pulpa dental. El ectomesenquima que rodea a la papila dentaria y al órgano del esmalte se le denomina folículo dentario y dará origen a los tejidos de soporte del diente o periodonto. El órgano del esmalte, la papila dentaria y el folículo dentario constituyen el órgano dentario o germen dentario. Como la formación dental resulta de la interacción epitelial-mesenquimal, dos poblaciones diferentes de células deben ser consideradas: las células madre epiteliales que dan origen a los ameloblastos y las células madre mesenquimales o mejor dicho ectomesenquimales que dan origen a los odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal (Nanci., 2013).

2.3.3. Características de las Células Madre de Pulpa Dental (CMPD).

Luego de una injuria dental, la pulpa dental está involucrada en un proceso de dentinogénesis de reparación, donde las células elaboran y depositan dentina nueva. También se ha demostrado que la pulpa dental adulta contiene precursores capaces de formar odontoblastos bajo las señales apropiadas (Gronthos et al., 2000). La reparación dental dura toda la vida sugiriendo que las células madre mesenquimales deben existir en la pulpa dental adulta. Las CMPD fueron aisladas y descritas por primera vez a partir de pulpa dental humana en el 2000 por Gronthos et al. como “células madres de pulpa dental humana postnatales” o “*postnatal human dental pulp stem cells*” (DPSC). Estas células fueron obtenidas a partir de pulpa dental de terceros molares permanentes impactados. También pueden obtenerse a

partir de dientes permanentes descartados como terceros molares extraídos, dientes supernumerarios o dientes extraídos por motivos ortodónticos.

Luego de conocidas las CMPD, 4 tipos más de CMM derivadas de tejidos dentales fueron aisladas y caracterizadas:

- células madre derivadas de dientes deciduos (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth - SHED* o *immature dental pulp stem cells - IDPSC*) descritas por Miura et al., (2003); Kerkis et al., (2006).
- las células madre de ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells - PDLSC*) descritas por Seo et al., (2004).
- las células madre derivadas de la papila apical (*stem cells from apical papilla- SCAP*) descritas por Sonoyama et al., (2006)
- se ha descrito una población de células precursoras del folículo dental (*dental follicle precursors cells- DFPC*) reportado por Morszeck et al., (2005).

Por lo tanto pueden obtenerse células madre de tejidos dental en desarrollo (SCAP y DFPC), dientes inmaduros (SHED) o permanentes (DPSC y PDLSC).

Las CMPD son células tipo fibroblásticas adherentes al plástico. Son capaces de formar colonias clonogénicas *in vitro* mostrando su capacidad de autorenovación. No existe un marcador inmunofenotípico de superficie que caracterice exclusivamente las CMPD. Los marcadores de superficie de las CMPD humanas mediante citometría de flujo muestran positividad a CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, STRO-1 y negativos para CD45, CD34, CD14, CD54, CD133 (Huang et al. 2009) cumpliendo con los criterios de la ISCT (Dominici et al. 2006). También mostraron expresión de marcadores de pluripotencia como Oct4, Nanog, Sox2, c-Myc (Liu et al., 2011). El nicho de estas células en un diente adulto no ha sido identificado claramente pero se sugiere que puede derivar de un nicho perivascular dada su positividad a marcadores como STRO-1, CD146 y 3G5 (Shi & Gronthos, 2003).

Estas células además de su potencial odontogénico, presentan diferenciación adipogénica y neurogénica (Gronthos et al., 2002), osteogénico, condrogénico, miogénico (Zhang et al., 2006) y hepatogénico (Ishkitiev et al., 2010). Durante su caracterización, las CMPD han sido comparadas con células madre mesenquimales de médula ósea, viendo que las células madre dentales tienden a ser más odontogénicas que osteogénicas, siendo esta una característica importante que las colocó en la mira de las terapias odontológicas (Gronthos et al, 2002). Observaron que estas células mostraban un mayor potencial de proliferación que las células madre de médula ósea (Gronthos et al, 2002). Otra característica distintiva ha sido la capacidad de formar un complejo dentino pulpar con vascularización y rodeado de osteoblastos de forma ectópica cuando es inyectado junto con hidroxapatita en ratones inmunocomprometidos (Gronthos et al, 2000). También se ha probado la regeneración pulpar completa utilizando CMPD autólogas en perros luego de realizar la pulpectomía (Iohara et al, 2011).

Las CMPD han sido descritas como una población heterogénea (Gronthos et al, 2000) de la cual dos tercios de las colonias fueron capaces de formar el complejo dentino pulpar y el otro tercio solo generó una cantidad limitada de dentina (Gronthos et al 2002) mostrando así su deferencia de potencialidad. Otro grupo de investigadores (Carinci et al., 2008) encontraron una subpoblación de CMPD con potencial osteogénico. Las denominaron

“osteoblastos derivados de células madre de pulpa dental humana” (ODHPSC). Hay estudios que reportan la presencia de dos poblaciones diferentes dentro de las CMPD, una STRO-1+, c-kit+, CD34- y otra STRO-1+, c-kit+, CD34+. Esta última mostró una diferenciación neurogénica más marcada, una proliferación menor que las anteriores y signos de senescencia más precoces. Este comportamiento puede ser evidencia de un origen embriológico distinto, mesodérmico *vs* ectomesodérmico (Pisciotta et al., 2015).

Una característica interesante del diente como fuente de células madre es que estas pueden encontrarse aun en tejidos inflamados o tejidos dentales enfermos manteniendo sus propiedades de CMM y potencial de regeneración tisular (Alongi et al., 2010). Esto hace a la pulpa dental inflamada una potencial fuente de células madre obtenida a partir de material biológico de descarte habitual. Alongi et al 2010 observó que las CMPD de pulpa inflamada, presentaron una capacidad de diferenciación menor. Las CMPD aisladas de piezas con pulpitis irreversible (Pereira et al, 2012) y periodontitis agresiva (Sun et al., 2014) mantuvieron *in vitro* sus propiedades de CMM aunque ligeramente disminuida. No se observaron diferencias morfológicas o de proliferación entre CMPD normales de las derivadas de tejidos inflamados aunque el éxito para establecer un cultivo a partir de pulpas inflamadas en comparación con las normales fue menor, probablemente por la obtención de menor cantidad de muestra (Pereira et al., 2012). Según Werle et al. (2016) los dientes deciduos cariados son fuente viable de células madre utilizables. Sin embargo, Yazid et al. (2014) concluyen que las células madre de pulpa inflamada de dientes deciduos es disfuncional en sus propiedades de células madre y de inmunomodulación, no siendo viable como fuente para su aplicación terapéutica. Los reportes plantean una controversia sobre las CMPD inflamada.

2.3.4. Potencial regenerativo de interés terapéutico de las CMPD

Las CMPD al igual que otros tipos de CMM presentan efectos tróficos y capacidad inmunomoduladora. Se ha visto que son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina en un 91% en ensayos de cocultivo (Pierdomenico et al., 2005). El co-cultivo de CMPD con linfocitos T promovió la producción de VCAM-1, ICAM-1, TGF- β , IL10 y disminuyó las citoquinas proinflamatorias como IL6, receptor de IL2, IL12, IL17 y TNF alfa (Demircan et al., 2011).

Las CMPD han presentado propiedades que las hicieron atractivas para su uso terapéutico no solo en odontología humana sino sobre trastornos de diversos órganos con resultados interesantes. Son fuertemente consideradas para regeneración nerviosa por su origen cercano a la cresta neural. Las CMPD pueden promover la proliferación y diferenciación de células neurales en el hipocampo de ratones (Huang et al., 2008). En modelos de lesión nerviosa periférica, túbulos artificiales con CMPD lograron promover la regeneración nerviosa con mielinización de fibras (Sasaki et al., 2011). Las CMPD lograron reconstruir el epitelio corneal en un modelo de deficiencia de células madre limbales (Gomes et al., 2010; Syed-Picard et al., 2015) y preservar la función retinal (Mead et al., 2017). Lograron reducir el área de infarto de miocardio, mejorar la función ventricular e inducir la revascularización por inyección intracardiaca (Gandia et al., 2008); en otro estudio lograron migrar, incorporarse y mostrar potencial miogénico cuando se inyectan CMPD inmaduras humanas

en perros Golden retriever con distrofia muscular (Kerkis et al., 2008). Al presentar una buena capacidad osteogénica pueden formar hueso cuando se combina con plasma rico en plaquetas o hidroxapatita (Yamada et al., 2010), mostraron mayor potencial osteogénico que las células madre de medula ósea y células periostales y fueron útiles para regenerar tejido alrededor de implantes dentales (Ito et al., 2011) y también las DFPC fueron una buena fuente de células madre para regeneración ósea alrededor de implantes de titanio (Lucaciu et al., 2015). También fueron usadas como tratamiento de osteoartritis crónica mediante inyección alogénica intraarticular de CMPD en perros (Bootcha et al. 2015). Lograron incorporarse y estimular la angiogénesis y vasculogénesis en modelos de isquemia de miembro posterior en ratones (Iohara et al., 2008). En hígado, consiguieron prevenir la progresión de fibrosis hepática y contribuir a la restauración de la función hepática en ratas (Ikeda et al., 2008). Actualmente se encuentra en fase de reclutamiento un ensayo clínico que plantea la utilización de las CMPD vía intravenosa para tratar la diabetes tipo 2 (NCT03658655).

Dentro de la odontología, las CMPD son prometedoras para disciplinas como la endodoncia, periodoncia e implantología. Existen ensayos clínicos en humanos con pulpitis que recibieron un trasplante autólogo de CMPD y se obtuvo una regeneración pulpar completa, con angiogénesis y formación nerviosa (Nakashima et al., 2017). Existen reportes de casos de reparación de defectos óseos craneofaciales o alveolares con CMPD autólogas en combinación con esponjas colágenas (d'Aquino et al., 2009). También hay un seguimiento de un año de casos en los que se trataron defectos infraóseos causados por periodontitis con CMPD y esponjas colágenas mostrando mejoría de la altura ósea (Aimetti et al., 2018). Esto resulta interesante, ya que un estudio realizado en Estados Unidos indica que el motivo de consulta más frecuente en las clínicas veterinarias tanto en perros como en gatos es el cálculo dental y en segundo lugar la gingivitis (Lund et al. 1999), los cuales resultan ser los signos principales de la enfermedad periodontal en estos pacientes. Otro estudio de Inglaterra de prevalencia de desórdenes registrados en felinos coloca la enfermedad periodontal como el desorden más frecuentemente diagnosticado (O'Neill et al., 2014). Por lo tanto, sería interesante conocer las características de las CMPD caninas y felinas para poder plantear nuevas alternativas terapéuticas para la enfermedad periodontal. Existen reportes en caninos que fueron anteriormente mencionados pero, a la fecha, no hay ningún reporte sobre CMPD en felinos.

2.4. ESTABILIDAD CITOGENÉTICA DE LAS CM *in vitro*

La frecuencia de las CMM en un tejido adulto es muy baja, aproximadamente $1:10^6$ células en la medula ósea aunque es 100 a 1000 veces más alta en el tejido adiposo o cordón umbilical (Oberbauer et al., 2015). Específicamente en felinos la frecuencia de CMM es de 1 en $3,8 \times 10^5$ células mononucleares de medula ósea (Martín et al. 2002). Sin embargo, es necesaria la expansión *ex vivo* para obtener un número de células apropiado para una terapia con CMM que como se mencionó anteriormente suele ser mayor a 2×10^6 CMM por individuo. Se sabe que las condiciones de cultivo *in vitro* implican estrés replicativo para las células, lleva a la senescencia celular y esto puede generar alteraciones cromosómicas en la célula cultivada (Neri, 2019).

Al parecer, a diferencia de lo que se observa en las CME o las iPS, las CMM mantendrían su estabilidad genética durante el cultivo (Baker et al., 2007; Bernardo et al., 2007; Lamm et al., 2016; Neri et al., 2013). A nivel internacional existe una gran incertidumbre acerca de la estabilidad genética de las CMM *in vitro* en humanos. Existieron trabajos que reportaban una malignización *ex vivo* de las CMM pero que luego fueron retractados debido a la falta de reproducibilidad de los resultados y contaminación de los cultivos con líneas tumorales (de la Fuente et al., 2010; Rubio et al., 2005). Si bien no han demostrado transformaciones malignas, han detectado una elevada proporción de aneuploidías cromosómicas que se acumulan rápidamente en los cultivos (Cornélio et al. 2014).

Las aneuploidías surgen en aquellas células que se están dividiendo como consecuencia de errores durante la mitosis, particularmente no disyunciones mitóticas. En animales domésticos pueden observarse fallas reproductivas, o fenotipos de intersexualidad que permiten una sospecha de las alteraciones. A nivel de cultivo el fenotipo celular permanece incambiado y de hecho la presencia de trisomías totales o parciales podría representar un cambio adaptativo ventajoso, lo que llevaría a un reemplazo de la población celular normal en los sucesivos pasajes (Meisner & Johnson, 2008).

Duesberg et al. (2006) postularon la teoría de la evolución cromosómica del cáncer que hoy en día tiene varios adeptos. Los autores sostienen que la acumulación de aberraciones cromosómicas (aneuploidias, poliploidías, gaps, fracturas, etc) llevaría directamente a un aumento de la inestabilidad genómica con modificaciones groseras a nivel de la expresión de muchos genes, lo que constituiría una verdadera base para la selección de las células tumorales. Las aneuploidías no son las únicas alteraciones detectadas a la fecha en cultivos *in vitro* de CMM. Hay estudios que reportan estabilidad cromosómica en cultivos de CMM derivadas de médula ósea humanas hasta el pasaje 2, sin embargo la presencia de gaps, fracturas y poliploidías en pasajes posteriores podrían constituir un paso intermedio para la malignización en cultivos a largo plazo (Borgonovo et al. 2014).

En los últimos años han surgido estudios que plantean un “efecto de doble filo” de las CMM mencionando su capacidad tanto de promover tumores como de controlarlos (Lee & Hong, 2017) incluso se ha planteado el potencial terapéutico de CMM contra cáncer debido a su liberación de factores antitumorales, activación o inhibición de determinadas vías relacionadas a la proliferación tumoral (Javan et al. 2019), mostrando que aún no se ha elucidado la relación de las CMM en la oncogénesis.

La información disponible acerca de la estabilidad citogenética de las CMM aún es limitada y los resultados no son claros en humanos (Neri, 2019; Stultz et al., 2016; Wang et al., 2012), mucho menos aún en animales domésticos. Esta incertidumbre hace necesario controlar y caracterizar citogenéticamente las poblaciones de CMM.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La información disponible sobre características *in vitro* de CMM TA felinas es restringida comparada a otras especies domésticas a nivel internacional y hasta el momento no existen reportes sobre células madre derivadas de pulpa dental felina.

Desde el punto de vista de la medicina regenerativa, el conocimiento del comportamiento básico *in vitro* de un cultivo de CMM es imprescindible para establecer los parámetros que permiten generar protocolos eficientes y seguros para realizar una terapia celular. Distintas fuentes pueden presentar características diferentes que resulten favorables para determinadas terapias. En este sentido, el origen ectomesenquimal de las CMPD otorga características diferenciales pero aún no han sido descrito su aislamiento en felinos. Además, la expansión celular implica cultivo *in vitro* prolongado y no está claro si esta condición puede alterar o no la estabilidad de las CMM y la información en felinos es nula. Las principales interrogantes que se plantean en esta tesis son 1) ¿Cómo se comportan las CMM TA felinas *in vitro*? 2) ¿Cómo se comportan las CMPD felinas *in vitro*? 3) ¿Las CMM TA y CMPD mantienen sus propiedades y su estabilidad a lo largo de sucesivos pasajes celulares?

Además se pretende incrementar las CMM felinas del ya existente biobanco de CMM de origen animal del Área de Inmunología de Facultad de Veterinaria con fines de investigación y perspectivas terapéuticas.

3.1. HIPÓTESIS

Las CMM TA felinas y las CMPD felinas mantienen sus características de células madre mesenquimales y su estabilidad citogenética en sucesivos pasajes celulares *in vitro*.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la proliferación, multipotencialidad y estabilidad citogenética de las CMM TA y las CMPD felinas.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar y expandir *in vitro* CMM TA y CMPD felinas.
2. Evaluar la capacidad clonogénica y proliferativa de ambas fuentes en diferentes pasajes.
3. Evaluar la multidiferenciación *in vitro* de las CMM TA y CMPD felinas.
4. Evaluar la estabilidad citogenética *in vitro* de CMM TA y CMPD felinas en diferentes pasajes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseños experimentales

Para evaluar el comportamiento y características *in vitro* se aislaron CMM-TA de tejido adiposo extraído de felinos donantes negativos a Virus de Inmunodeficiencia Felina (VIF) y Virus de Leucemia Felina (ViLeF) mediante ensayo rápido de inmunocromatografía. Se realizó el aislamiento de CMM TA por método enzimático, cultivo y expansión de CMM TA y se efectuaron pruebas de proliferación en los pasajes 2, 4 y 6 (P₂, P₄, P₆ respectivamente) y prueba de tridiferenciación en P₂. Con el fin de estudiar su estabilidad citogenética se realizaron en estos mismos pasajes una evaluación citogenética de las células. Para evaluar el comportamiento de las CMPD felinas se utilizaron piezas dentales extraídas de cadáveres de felinos, utilizando como método de aislamiento el explante y siguiendo la misma estrategia de evaluación que para CMM-TA. Las muestras de tejido adiposo y pulpa dental no fueron tomadas del mismo individuo ya que los donantes fueron pacientes por lo que se evitaron las maniobras invasivas innecesarias.

4.2. Obtención de muestras:

Tejido adiposo:

Se recibieron muestras de TA subcutáneo o intrabdominal de aproximadamente 1 gramo de 6 felinos hembra jóvenes de 1 a 3 años de edad clínicamente sanas, tomadas durante ovariectomías efectuadas en el Hospital de Pequeños Animales de la Facultad de Veterinaria, UdelaR de manera rutinaria. Las muestras fueron colocadas en frascos estériles y almacenados a 4°C hasta su procesamiento. Protocolo autorizado por la CEUAFVET-PI-144.

Sangre periférica:

De cada felino donante de tejido adiposo se obtuvo una muestra de 1 ml de sangre sin anticoagulante tomado de la vena cefálica durante el procedimiento quirúrgico. La sangre fue centrifugada a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente para obtener suero, el cual fue separado y utilizado para serología de VIF y ViLeF. Protocolo autorizado por la CEUAFVET-PI-144.

Pulpa dental:

Se recibieron piezas dentales de 4 cadáveres de felinos de 8 meses, 10 meses, 1,5 años y 10 años. Se utilizaron piezas de felinos fallecidos por causas no infecciosas ni oncológicas atendidos en el Hospital de Facultad de Veterinaria o clínicas veterinarias particulares y cuyos propietarios por decisión propia decidieron no conservar el cadáver. Las piezas dentales se extrajeron en un periodo no mayor a 6 horas *postmortem* realizando la antisepsia oral con yodopovidona y enjuagado con suero fisiológico. Para extraer la pieza dental se realizó una sindesmotomía para romper la adherencia gingival, se luxó el ligamento periodontal con elevador y una vez que la pieza adquiere movilidad se extrajo con fórceps.

Las muestras dentales se almacenaron en PBS con 2% de Penicilina – Estreptomicina a 4°C hasta su procesamiento.

4.3. Serología de VIF y ViLeF de los animales donantes de tejido adiposo

Debido a que las muestras se criopreservaron e incorporaron al Banco de Células Madre del Área de Inmunología, se realizó un control infeccioso básico de los felinos donantes de TA y únicamente se incluyeron las muestras de animales negativos mediante serología para VIF y ViLeF. Se detectó mediante inmunoensayo rápido FASTest FeLV-FIV (Megacor cat. Num 761050RG1) la presencia de antígenos de ViLeF (Sen. 95 %Esp. 99 %) y anticuerpos específicos contra VIF (Sen. 96,7 %/Esp. 98,8 %) en suero de las muestras de sangre sin anticoagulante obtenidas de los felinos donantes. El ensayo se realizó según las recomendaciones del fabricante.

4.4. Aislamiento y cultivo de CMM-TA

Aislamiento:

Las muestras fueron procesadas en un tiempo máximo de 24 horas luego de la extracción. El TA se cortó en trozos pequeños y se dispuso en un tubo con solución tampón fosfato salino (PBS), posteriormente se lavó dos veces. El TA se sometió a una digestión enzimática durante 40 minutos a 37 °C en agitación en una solución de Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) bajo en glucosa (Gibco) con 0,1 mg/ml de colagenasa tipo I (Gibco). Posteriormente se centrifugó a 700g durante 10 minutos. El pellet se resuspendió y sembró en placas de cultivo de 6 hoyos (Celstar). La composición del medio de crecimiento utilizado fue DMEM, 20% suero fetal bovino (SFB) (Capricorn) y 2% de antibiótico: 100U/ml de penicilina G, 100U/ml de estreptomicina (Capricorn). Adaptado de Quimby et al. (2013).

Expansión y cultivo:

Las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio de crecimiento e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Se evaluó diariamente la morfología y el crecimiento celular, cada 72 horas se cambió el medio de crecimiento. Una vez obtenidas las primeras células adherentes al plástico se bajó la concentración de SFB a 10% y se mantuvo durante el periodo de cultivo. Se realizó el pasaje celular al llegar al 80% de confluencia, protocolo adaptado de Quimby et al., (2013). Las células se conservaron en 95% de SFB y 5% de DMSO y almacenadas a -80°C.

4.5. Obtención de pulpa dental, aislamiento y cultivo de CMPD

Obtención de pulpa dental

Las piezas dentales se procesaron en un período no mayor a 24 horas de su extracción. Los dientes fueron desinfectados con alcohol 70% y yodopovidona e inmediatamente enjuagados en PBS. La pulpa dental fue exteriorizada mediante 2 métodos según la apexificación del diente. Para dientes no apexificados se extrajo mediante extirpador endodóntico a través del foramen apical. Para dientes ya apexificados se quebró la pieza dental con fórceps

exponiendo la pulpa dental y permitiendo retirarla de la cámara pulpar con el extirpador endodóntico. La pulpa dental fue irrigada con PBS y procesada inmediatamente.

Aislamiento y cultivo de CMPD

El aislamiento se realizó mediante el método de explante descrito por Hilkens et al, (2013). Se cortó la pulpa dental con hoja de bisturí en pequeños trozos de 1mm y se colocaron directamente sobre placas de 6 pocillos. El fondo de estas placas fue previamente acondicionado realizando un rayado en forma de cuadrícula con hoja de bisturí a una inclinación de aproximadamente 45° para facilitar la adherencia de los trozos. A cada pozo se adicionó medio de cultivo cuya composición fue Alfa MEM suplementado (Gibco) con 20% de SFB (Capricorn), 100U/ml de penicilina G, 100U/ml de estreptomicina (Capricorn) y mantenidas a 5% de CO₂ a 37°C (Sun et al, 2014). Una vez visualizadas las primeras células adherentes se redujo la concentración de SFB a 10%. Se cambió el medio cada 3 o 4 días y el pasaje celular se realizó al alcanzar el 70-80% de confluencia. Las células se conservaron en 95% de SFB y 5% de DMSO y almacenadas a -80°C.

4.6. Caracterización de las CMM TA y CMPD felinas.

4.6.1. Morfología:

Se sembraron células de ambas fuentes en P₂, P₄ y P₆ sobre cubreobjeto en placas de 6 hoyos a densidades de 1×10⁴ y se cultivaron durante 5 a 7 días en medio de crecimiento. Se fijaron con formaldehído al 4% por 10 minutos y se tiñeron con Giemsa por 15 minutos. Las imágenes fueron digitalizadas utilizando una cámara digital Evolution VF (Media Cybernetics) y el software Image Pro-Express 6.0 (Media Cybernetics). Se determinó la relación núcleo/citoplasma (rel. N/C) mediante el software de imagen ImageJ 1.52a (NIH). Las descripciones morfológicas de las variaciones nucleares se hicieron en base a los criterios de Thomas et al, (2009) y Bolognesi et al, (2015).

4.6.2. Capacidad proliferativa *in vitro*:

Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias - Fibroblásticas (CFU-F –Colony forming units fibroblasts)

Se realizó el ensayo para CMM TA y CMPD en P₂, P₄ y P₆. Las células fueron colocadas en placas de cultivo de 6 hoyos en triplicado a una densidad de 1×10³ células por hoyo y cultivadas en medio de crecimiento anteriormente descrito para cada tipo celular. Se cambió el medio de cultivo cada 3 o 4 días. Las colonias fueron fijadas alrededor del día 14 con metanol frío (-20 °C) durante 10 minutos y teñidas con Giemsa por 15 minutos. Las colonias fueron contadas mediante el software de análisis de imagen ImageJ 1.52a (NIH). Los resultados fueron expresados como número de colonias por cm² y como porcentaje de eficiencia de formación de colonias calculada como número de colonias formadas dividido el número de células sembradas por 100, adaptado de Gómez et al, (2015).

Tiempo de doblaje celular (DT-Doubling Time)

Se calculó el tiempo de doblaje de las CMM TA y CMPD felinas en P₂, P₄, P₆. Para ello se sembraron por triplicado 1×10^4 células por hoyo en placas de cultivo de 6 hoyos. Se cultivaron en el medio de cultivo especificado anteriormente hasta un 80% de confluencia, momento en el cual son tripsinizadas utilizando tripsina porcina durante 2 a 3 minutos a 37°C y neutralizada con medio de crecimiento, cosechadas y contadas en cámara de Neubauer. El tiempo de doblaje se calculó mediante la fórmula $DoublingTime = duration * \log(2) / [\log(FinalConcentration) - \log(InitialConcentration)]$. (<http://www.doubling-time.com/compute.php>) Adaptado de Gómez et al, (2015).

4.6.3. Tridiferenciación *in vitro* (CMM TA y CMPD)

Se utilizó un protocolo adaptado a partir de los protocolos de Quimby et al, (2015) y protocolos propios del laboratorio para diferenciación en otras especies.

En P₂, P₄ y P₆ se sembraron 1×10^4 células en placas de cultivo celular de 24 hoyos, por triplicado. Después de 24-48 horas de siembra con medio de crecimiento se comenzó la inducción de diferenciación *in vitro*:

Diferenciación osteogénica: se adicionó 60 µM dexametasona (Sigma), 10 mM β-glicerofosfato (Sigma) y 1,7 mM ácido ascórbico (Sigma). Las células se mantuvieron 21 días en el medio de diferenciación con cambio cada 3-4 días. Después se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 15 minutos y la presencia de matriz mineralizada se determinó mediante la tinción Alizarin Red S (Sigma).

Diferenciación adipogénica: el medio de crecimiento fue adicionado 500 µM isobutilmetilxantina (Sigma), 60 µM indometacina (Sigma), 1 µM dexametasona (Sigma). Las células se mantuvieron 21 días en inducción con cambio de medio cada 3-4 días. Después se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 15 minutos, la presencia de gotas lipídicas, se evaluó con la tinción Oil Red O (Sigma).

Diferenciación condrogénica: el medio de crecimiento adicionado con 1,7 mM ácido ascórbico (Sigma), 10 ng/ml TGF-β (Sigma). Las células se mantuvieron 21 días en inducción con cambio de medio cada 3-4 días. Para evaluar la diferenciación, las células se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 15 minutos. Después fueron teñidas con Alcian Blue para detectar la presencia de matriz cartilaginosa.

4.7. Evaluación de estabilidad citogenética

Puesta a punto del tiempo de acción de agentes mitóticos y porcentaje de confluencia.

En el estudio citogenético de células en monocapa se depende exclusivamente de la tasa de proliferación del cultivo, ya que no se utilizan agentes inductores de la mitosis. De la misma forma, el tiempo de acción de los agentes de arresto de la mitosis (ej. Colcemid) debe

ajustarse para cada especie y tipo celular. Por este motivo, se realizaron pequeños ensayos para evaluar el tiempo óptimo de Colcemid a utilizarse, cultivando CMM TA con 1, 2 y 3 horas de exposición al Colcemid. Asimismo se evaluó el % de confluencia óptimo para obtener un mayor número de metafases, procesando cultivos con 50-60% de confluencia y cultivos con un 70-80% de confluencia.

En base a los ensayos preliminares de puesta a punto del tiempo de acción de los agentes mitóticos y porcentaje de confluencia, el tiempo óptimo de acción del Colcemid fue de 2 horas y el % de confluencia más adecuado fue de 50-60%. En estas condiciones se obtienen una cantidad aceptable de metafases analizables (n=20) para estudio citogenético. En los casos en que fue posible, se analizó un número mayor de metafases. Se utilizaron los mismos parámetros para CMPD.

Control citogenético de las CMM TA y CMPD felinas:

La estabilidad cromosómica de ambas fuentes de CMM se evaluó en los pasajes P₂, P₄ y P₆. Para esto, las células de cada pasaje fueron cultivadas hasta un 50-70% de confluencia. Se incorporó a cada placa de cultivo Colcemid a una concentración de 0,1 µg/mL y se incubó por un tiempo de 2 horas en condiciones de cultivo estándar, para detener las células en metafase. La monocapa fue levantada con tripsina y las células cosechadas fueron traspasadas a tubo cónico de 15mL al cual se le adicionó 3mL de medio DMEM. La muestra se centrifuga a 250g por 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante. El tiempo de exposición al Colcemid fue determinado mediante un ensayo piloto (mencionado en la sección anterior) decidiendo protocolizar el procedimiento en 2 horas. Cada muestra fue tratada con solución hipotónica de KCl (0,075M) a 38°C por 15 minutos y fijada con solución Carnoy (Metanol-Ácido acético 3:1). Se realizaron 3 lavados con la solución Carnoy y se almacenó a 4°C. Los extendidos cromosómicos fueron realizados sobre portaobjetos previamente acondicionados con metanol a -20°C, fijados a la llama y teñidos con colorante Giemsa 3% (pH=6,8). Las preparaciones fueron observadas en microscopio óptico Olympus BX60 bajo objetivo de inmersión 100X. Las imágenes fueron digitalizadas utilizando cámara digital Evolution VF (Media Cybernetics) y el software Image Pro-Express 6.0 (Media Cybernetics). Se evaluaron un mínimo de 20 metafases completas por animal. El análisis, interpretación y cariotipo de cada animal se realizó en base al estándar internacional de nomenclatura cromosómica felina (Cho et al., 1997) y las alteraciones estructurales se clasificaron según Udroui et al, 2017. El índice mitótico se calculó como el número de metafases observadas cada 1000 células nucleadas y fue expresado como porcentaje.

4.8. Análisis estadístico

Se utilizó el software Graphpad prism 6.01 para Windows. Se realizó la prueba de Kolmogorov Smirnov para analizar la normalidad de los resultados. Las pruebas de proliferación, de citogenética y los datos de morfología se analizaron de forma descriptiva y mediante tests no paramétricos como Mann Whitney o paramétricos como ANOVA y test t para los datos normalmente distribuidos. Para los resultados de muestras de CMPD se realizó un análisis descriptivo dado el reducido número de muestras y para el análisis de morfología

se usaron pruebas no paramétricas ya mencionadas. Se consideraron como diferencias significativas los valores con $p < 0,05$ y los valores entre $p > 0,05$ y $p < 0,10$ como tendencias.

5. RESULTADOS

5.1. Donantes y muestras

Tejido adiposo: Se procesaron 22 muestras de grasa de unos 0,5 a 2 gramos de felinos hembra de 6 meses a 5 años de edad. Se logró el aislamiento exitoso en 19 muestras. Se realizó serología de los donantes para VIF y ViLeF siendo 18 negativos y 1 positivo a VIF excluyéndose del estudio. Se utilizaron 13 muestras para el estudio, especificándose la cantidad usada por ensayo y en anexo Ia se especifican los datos de los donantes.

Pulpa dental: Se recibieron piezas dentales extraídas *postmortem* de 4 felinos de 8 meses, 10 meses, 1,5 años y 10 años, que consistieron en caninos inferiores, superiores y premolares. Se consiguió un mejor tamaño de muestra de pulpa dental de los caninos utilizando estos como muestra principal de este estudio. Se utilizaron para el estudio las muestras de los individuos de 8 meses (identificado como M2) y 10 meses (identificado como C1). Los datos de los donantes se especifican en el anexo Ib.

5.2. Aislamiento, expansión y morfología celular

CMM TA

Las primeras células se observaron entre 1 y 7 días en cultivo luego del procesamiento (promedio de $3,66 \pm 2,66$ días) (Figura 1, c y d). Las células presentaron una morfología fusiforme y tienden a crecer de forma homogénea sobre la superficie de la placa. Se observó el mismo comportamiento en P₁ y P₂. Disminuyeron su crecimiento 2 cultivos en P₃, 2 cultivos en P₄ y 4 cultivos en P₅. Estos estancamientos de crecimiento fueron acompañados de alteraciones morfológicas, con aumento de tamaño y alargamiento en las células, impidiendo efectuar pruebas en los subsiguientes pasajes celulares. En P₅ además se observó presencia de algunas vacuolas intracelulares y disminución de la refringencia. Durante el período de expansión, 2 cultivos presentaron una alteración en la dinámica de crecimiento formando acúmulos y estancando el crecimiento en P₃ y P₄ (Figura 2).

Se observó la morfología de CMM TA sembradas en cubreobjetos y teñidas con Giemsa en P₂, P₄ y P₆. Para evaluar las variaciones de tamaño se determinó la relación núcleo/citoplasma (rel. N/C) utilizando Image J (anexo II).

Se observó la morfología de CMM TA de 2 cultivos en P₂, 5 en P₄ y 2 en P₆.

En pasaje 2, las células presentaron un aspecto fusiforme, estrellado o mayoritariamente triangular, con un núcleo definido, observándose escasas células binucleadas. Se observaron diferencias significativas en la rel. N/C entre P₂ y P₄ ($p=0,014$). Cuando se comparó entre si la rel. N/C entre cultivos de un mismo pasaje, se observó que en P₂ la relación se mantenía ($p=0,52$). Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre los cultivos en P₄ y entre los cultivos en P₆ ($p=0,0001$ y $p=0,0003$). En pasaje 4 la morfología varía según el patrón de crecimiento de las células. Aquellos cultivos que mantuvieron un crecimiento continuo y un DT bajo ($n=2$ y $DT < 5$ días) presentaron una morfología similar a P₂. De forma contraria,

aquellas células con un DT notoriamente mayor en P₄ (n=3 y DT>5días) presentaron células más grandes, rectangulares y algunas de ellas mostraron un patrón nuclear moteado sugestivo de cariorrexis e incluso con pérdida de definición de la membrana nuclear sugiriendo cariólisis (Figura 4). En P₄, los cultivos con DT alto mostraron una rel. N/C menor que aquellos con DT bajo ($p<0,0001$). En otras palabras, los cultivos con DT alto presentaban células más grandes.

Se observaron grandes diferencias morfológicas en los cultivos analizados en P₆. El cultivo del individuo G10 mostro una morfología similar a los pasajes anteriores aunque con células más alargadas y en algunas se observaron signos de cariorrexis aunque no mostro diferencias estadísticas en la rel. N/C entre los 3 pasajes (Figura 3). Por otro lado, el cultivo del individuo R9 mostro escasa celularidad, células grandes con formato estrellado o rectangular, algunas células binucleadas (Figura 4c) y signos de cariólisis. Las principales alteraciones encontradas se ilustran en la Figura 4.

CMPD

Se logró el aislamiento de CMPD en 2 muestras (donantes M2 y C1) mediante el método de explante. Las primeras células adheridas al plástico se observaron a los 9 y 15 días de cultivo (Figura 1, a). Estas células presentan una morfología fusiforme aunque también se observan células con una tendencia más epitelioides que las CMM TA y de menor tamaño aparente a la observación en microscopio óptico invertido y que se mantiene a lo largo del cultivo. (Figura 1, b). Exhiben una capacidad de crecer en forma de colonias muy notoria aún en pasajes avanzados (pasaje 13). Los explantes se mantuvieron en cultivo emitiendo células durante 3 meses.

Contrario a lo observado en las CMM TA, las CMPD presentaron una morfología oval con citoplasma muy amplio, con afinidad perinuclear a la tinción Giemsa mientras que el resto del citoplasma periférico fue poco afín a la tinción (Figura 5). Se observó un aumento significativo ($p<0,0001$) en la rel. N/C a lo largo de los pasajes celulares (Figura 6). Además, estas células presentaron una rel. N/C menor a las CMM TA (Figura 6). A nivel nuclear, no se evidenciaron alteraciones a excepción de algunas células binucleadas (Figura 5b).

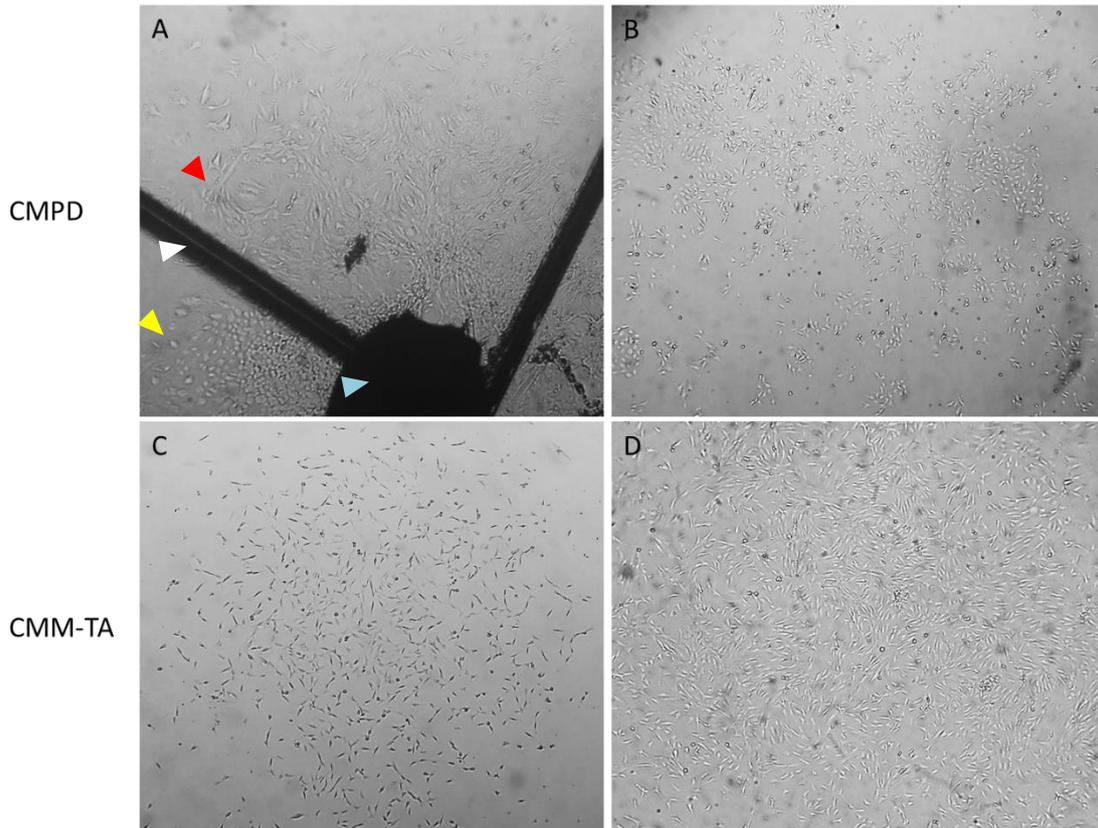


Fig. 1. Imagen microscópica de células madre derivadas de pulpa dental (CMPD) y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM TA) (4x) A) Explante de CMPD con células adheridas al plástico. Se indica con flecha celeste el explante de pulpa dental y en blanco las líneas marcadas sobre el fondo del pocillo para facilitar la adherencia del mismo, con amarillo células con aspecto epitelioide y en rojo células con aspecto fusiforme. B) CMPD en pasaje 1, se observan células más epitelioides. C) CMM TA luego de digestión enzimática y adheridas D) CMM TA en pasaje 1, se observa que las CMM TA aparentan un mayor tamaño y una morfología más fusiforme.



Fig. 2. Alteraciones de crecimiento en pasajes tempranos observadas en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (4x). A) Formación de acúmulos con estancamiento de crecimiento en pasaje 4. B) Enlentecimiento de crecimiento y alargamiento celular en pasaje 3 y C) en pasaje 5 donde se observan células alargadas, poco refringentes y con un crecimiento estancado, sugestivo de senescencia celular.

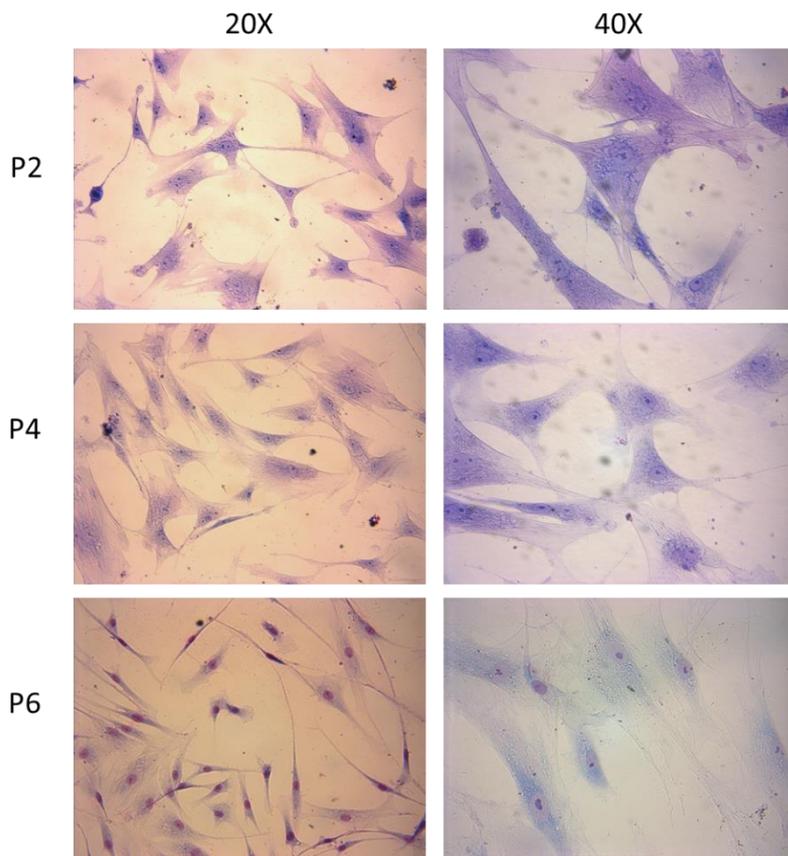


Fig. 3. Imágenes microscópicas (20× y 40×) de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo del individuo G10 en los pasajes celulares 2, 4 y 6 teñidas con Giemsa. Se observa un mantenimiento de morfología fusiforme similar en los 3 pasajes en este individuo en particular.

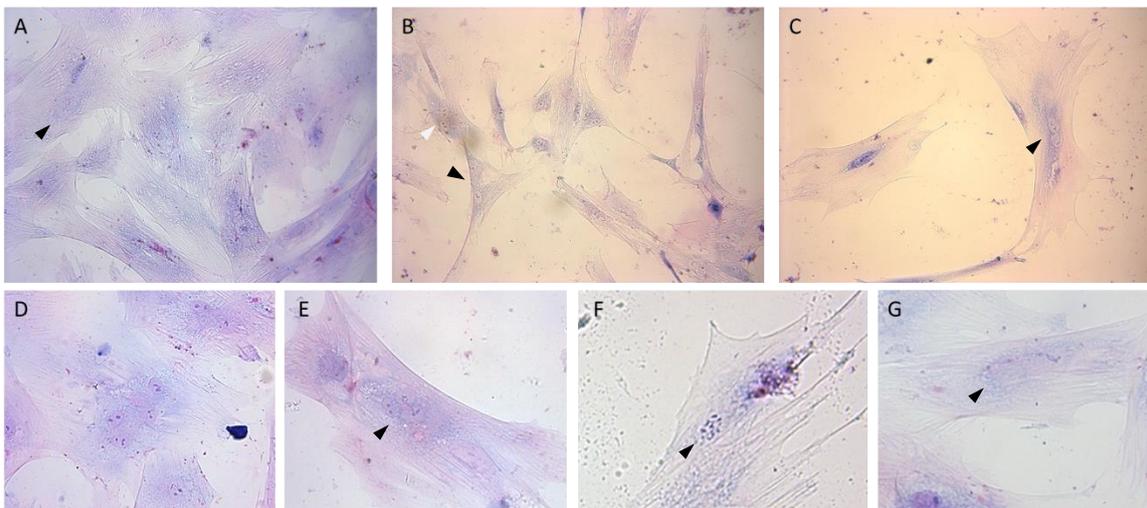


Fig. 4. Alteraciones morfológicas observadas durante el cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM TA) en pasaje 4 (P₄) y pasaje 6 (P₆). A) Imagen microscópica (20×) de CMM TA en pasaje 4. Se observan células de morfología rectangular, con núcleos cariorrexicos (flecha negra) y B) células triangulares (flecha negra) binucleadas (flecha blanca) en P₄. C) Imagen microscópica de CMM TA en P₆, se aprecia la baja celularidad. A la derecha se observa una célula binucleada (flecha negra). D) Célula

multinucleada en P₄, se observan 4 núcleos definidos. E) Célula trinucleada (flecha) en P₄. F) Célula cariorretrica en P₄, se aprecia condensación y fragmentación de cromatina nuclear (flecha negra). G) Célula cariolítica en P₄ (flecha negra), se observan restos de cromatina fragmentada y ausencia de bordes nucleares definidos dando un aspecto de núcleo fantasma.

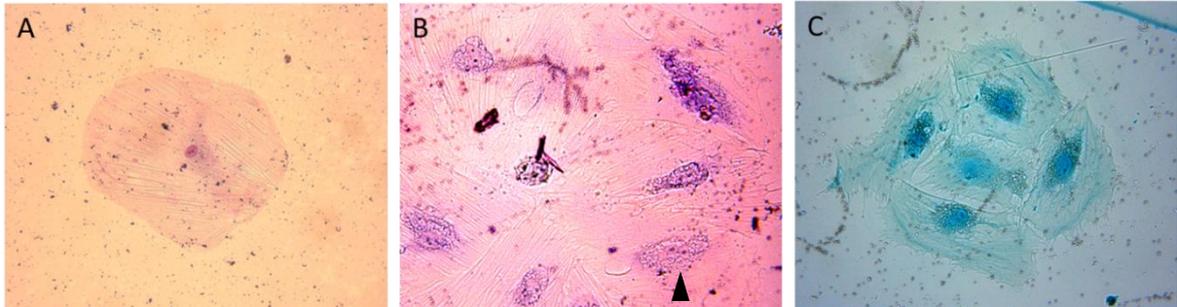


Fig. 5. Imágenes microscópicas (20x) de Células madre de pulpa dental felina en pasaje 2 (A), pasaje 4 (B) teñido con Giemsa y pasaje 6 (C) teñido con verde luz. Se aprecia una morfología redondeada y un citoplasma amplio poco afín al colorante. En B) se aprecia una célula binucleada (flecha negra). La imagen en pasaje 6 (C) fue teñida con verde luz sometido a calor porque no se logró teñir el citoplasma correctamente con Giemsa, las células presentan una morfología similar a pasaje 4.

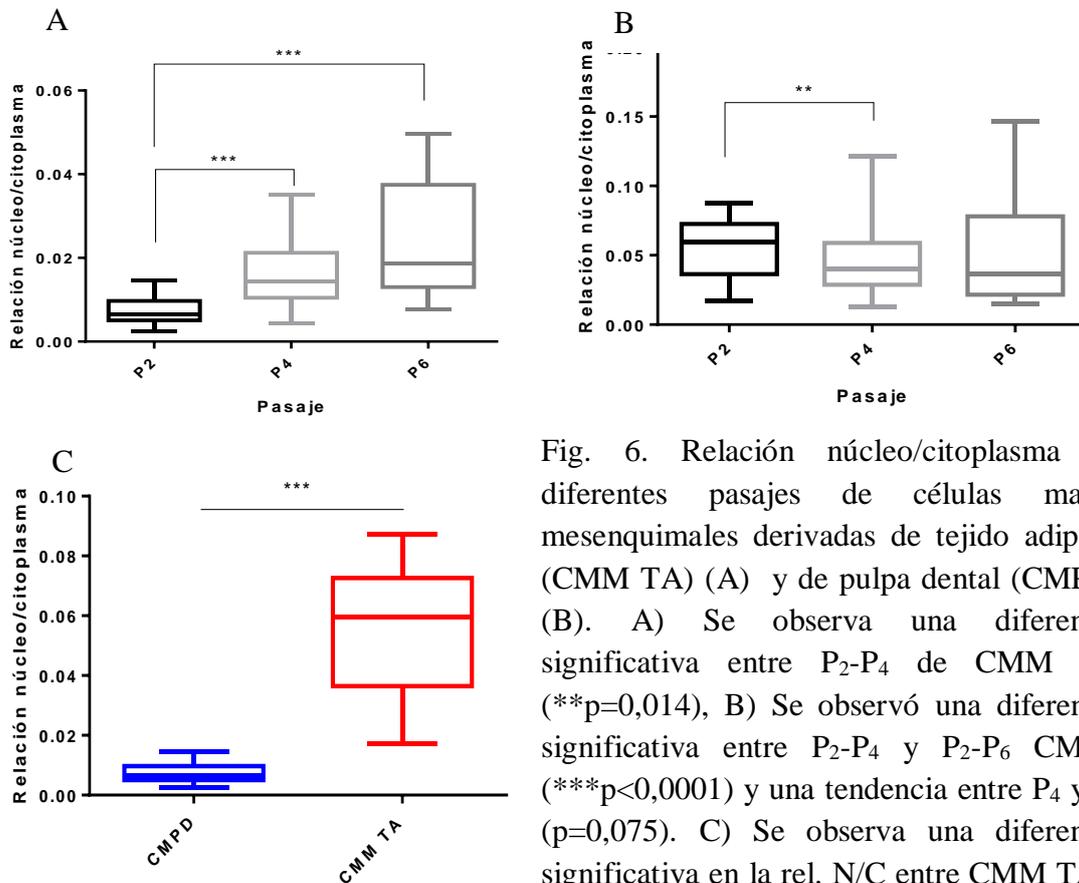


Fig. 6. Relación núcleo/citoplasma en diferentes pasajes de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM TA) (A) y de pulpa dental (CMPD) (B). A) Se observa una diferencia significativa entre P₂-P₄ de CMM TA (**p=0,014), B) Se observó una diferencia significativa entre P₂-P₄ y P₂-P₆ CMPD (**p<0,0001) y una tendencia entre P₄ y P₆ (p=0,075). C) Se observa una diferencia significativa en la rel. N/C entre CMM TA y CMPD (**p=0,0001).

5.3. Proliferación celular

5.3.1. Capacidad clonogénica (CFU-F)

CMM TA

Este ensayo se realizó con un total de 9 muestras de CMM TA confirmando su capacidad clonogénica (Figura 7 - 1^{er} columna) y observándose la siguiente dinámica (Cuadro I):

P₂: Se observó formación de colonias en 4 de las muestras analizadas. Las restantes muestras mostraron un crecimiento con formación de monocapa en vez de colonias. Se observó una media de eficiencia de formación de colonias de 3,550±1,902% en este pasaje, siendo el máximo, 6% y el mínimo 1,54%.

P₄: Se analizaron 7 muestras las cuales mostraron formación de colonias. Se observó una media de 1,770±1,743 % en este pasaje, siendo el máximo, 4,3% y el mínimo 0,16%. Dos muestras mostraron una disminución en el crecimiento en este pasaje. Otras 2 muestras mostraron una disminución franca de crecimiento en pasaje 3 con cambios morfológicos excluyéndolas del análisis en P₄.

P₆: De las 9 muestras, solo 2 llegaron con un crecimiento adecuado al pasaje 5 que permitiera realizar la prueba en pasaje 6. Únicamente una mostró crecimiento con una eficiencia de 5,40%.

Se observó una mayor capacidad clonogénica en P₂ que en P₄ aunque no hubo diferencias significativas (Figura 8). No se realizó análisis de P₆ ya que solo se obtuvo un resultado en 9 muestras indicando una caída en la capacidad clonogénica.

Cuadro I. Resultados de ensayo de capacidad clonogénica para las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM TA).

Id	P ₂		P ₄		P ₆	
	col/cm ²	%	col/cm ²	%	col/cm ²	%
G10	Monocapa	-	4,481	4,000	6,037	5,400
AV2	Monocapa	-	5,420	4,300	senescentes	-
G11	Monocapa	-	1,778	1,700	no creció	-
CAR	1,556	1,400	no creció	-	no creció	-
SHA	Monocapa	-	no creció	-	no creció	-
GRAA	4,185	3,700	0,185	0,160	no creció	-
GRAB	6,704	6,000	0,370	0,330	no creció	-
G9	sin dato	-	1,815	1,600	no creció	-
GRAC	3,481	3,100	0,370	0,300	no creció	-
<i>media</i>	3,981	3,550	2,060	1,770	-	-
<i>sd</i>	2,128	1,902	0,758	1,743	-	-

col/cm²: número de colonias por cm²

*porcentaje (%) de eficiencia de adherencia: colonias/n células sembradas*100*

Id: identificación del individuo.

CMPD

Este ensayo se realizó con un total de 2 muestras de CMPD evidenciando y confirmando su capacidad clonogénica (Figura 7 – 2^{da} columna). La dinámica observada se detalla en el Cuadro II. Se observó una buena capacidad formadora de colonias de las CMPD con respecto a las CMM TA y la misma se mantuvo a lo largo de los pasajes celulares (Figura 8).

Cuadro II. Ensayo de capacidad clonogénica para las Células madre derivadas de pulpa dental.

CFU para CMPD						
Id	P ₂		P ₄		P ₆	
	col/cm ²	%	col/cm ²	%	col/cm ²	%
C1	9,519	8,567	1,556	1,400	9,815	8,833
M2	13,333	10,666	10,333	9,300	9,500	7,600
<i>media</i>	11,426	9,617	5,944	5,350	9,657	8,217
<i>sd</i>	2,697	1,485	6,207	5,586	0,223	0,872

col/cm²: número de colonias por cm²

*porcentaje (%) de eficiencia de adherencia: colonias/n células sembradas*100*

Id: identificación del individuo.

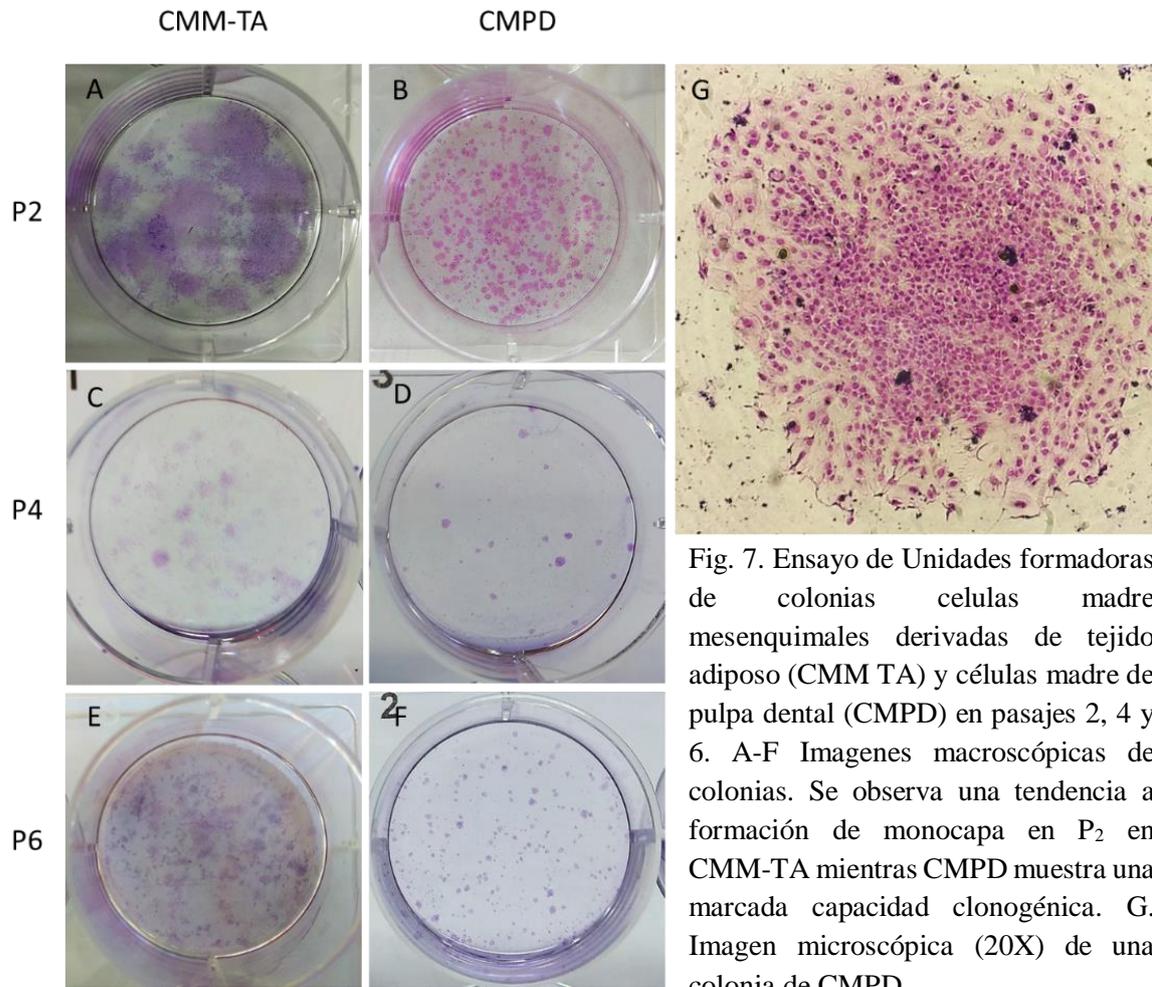


Fig. 7. Ensayo de Unidades formadoras de colonias células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM TA) y células madre de pulpa dental (CMPD) en pasajes 2, 4 y 6. A-F Imágenes macroscópicas de colonias. Se observa una tendencia a formación de monocapa en P₂ en CMM-TA mientras CMPD muestra una marcada capacidad clonogénica. G. Imagen microscópica (20X) de una colonia de CMPD.

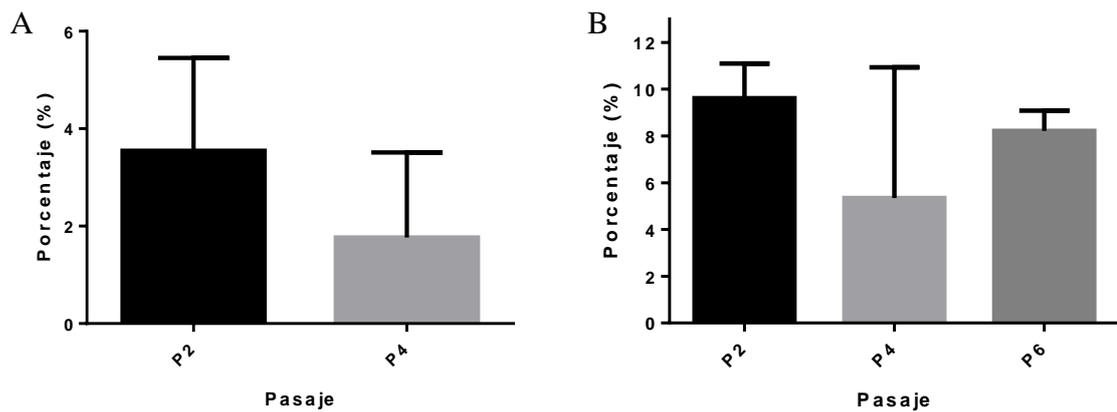


Fig. 8. Unidades Formadoras de Colonias de Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (A) y derivadas de pulpa dental (B) felinas en distintos pasajes. A. Se observa una mayor capacidad clonogénica en pasaje 2 aunque las diferencias no son significativas ($p=0,18$). B. Se observa una marcada capacidad clonogénica en los 3 pasajes.

5.3.2. Tiempo de Doblaje (DT)

CMM TA

Se analizaron 9 muestras en P₂, 7 en P₄ y 2 en P₆ (Figura 9A). Se observaron diferencias en el crecimiento a los largo de los sucesivos pasajes. El P₂ presentó un DT de $2,52 \pm 1,18$ días y P₄ de $9,41 \pm 6,24$ días, observándose una diferencia significativa en el DT entre ambos pasajes (Figura 9A). P₆ presentó un DT de $10,55 \pm 11,93$ no observándose diferencias con los otros pasajes. Los datos por individuos se detallan en el anexo III.a. La media de días en la que los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia fue $11,67 \pm 4,42$; $16,25 \pm 8,34$; $24,5 \pm 24,74$ para P₂, P₄ y P₆ respectivamente.

CMPD

Se analizaron 2 muestras. Se observó un tiempo de doblaje de $2,48 \pm 0,13$ y $5,11 \pm 0,50$ días en P₂; $9,38 \pm 0,70$ y $12,28$ días en P₄; $6,71 \pm 2,46$ y $10,24$ días en P₆. Se observa un aumento en el tiempo de doblaje a partir del P₄ (Figura 9B). Una de las muestras se analizó en P₈ obteniendo un DT de 9,950 días. Dado el numero bajo de muestras no se realizó análisis estadístico entre pasajes. La media de días en la que los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia fue $21,0 \pm 5,66$; $43,5 \pm 23,33$; $25,0 \pm 12,73$ para P₂, P₄ y P₆ respectivamente.

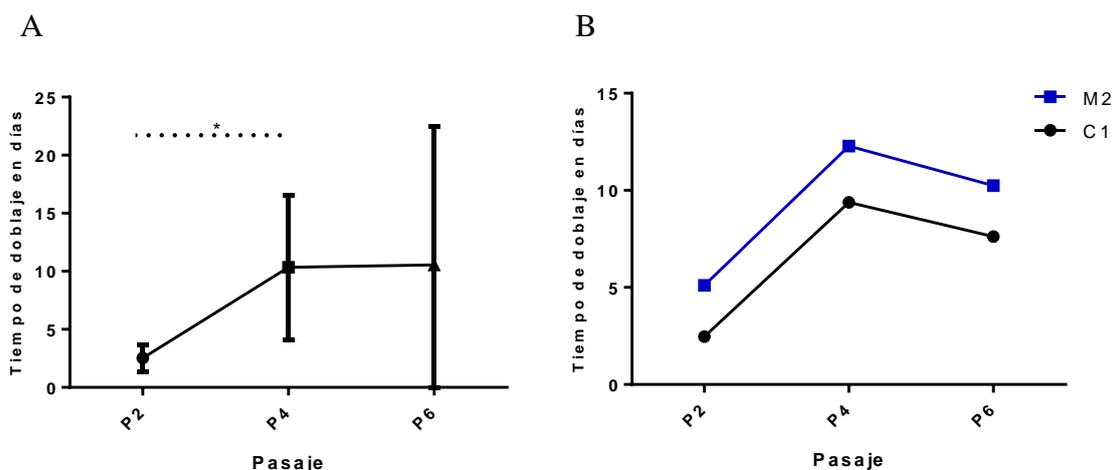


Fig. 9. Tiempo de doblaje en diferentes pasajes. A) células madre mesenquimales de tejido adiposo graficado en medias y desvío estándar y B) células madre de pulpa dental de las 2 muestras aisladas, indicando la identidad del individuo como C1 y M2 Se observa una diferencia significativa entre pasaje 2 y 4 para CMM TA (*) ($p=0,002$).

5.4. Tridiferenciación *in vitro*

CMM TA:

Se realizaron pruebas piloto de diferenciación de CMM TA felinas al trilineaje utilizando protocolos publicados (Quimby et al, 2015) y protocolos utilizados anteriormente en CMM TA equinas en el laboratorio del Área de Inmunología (Yaneselli et al., 2018). A raíz de estas pruebas pilotos se adaptó el protocolo de Yaneselli et al., (2018) el cual mostró una diferenciación más intensa y rápida.

Se sometieron a tridiferenciación 4 cultivos en P₂ de diferentes individuos obteniendo una diferenciación completa al trilineaje óseo, adiposo y cartilaginoso en 2 muestras y una diferenciación parcial en las otras 2 muestras, observándose en estas últimas, diferenciación condrogénica. Se produjo la diferenciación adipogénica en $11,8 \pm 7,01$ días, condrogénica en $7,6 \pm 2,30$ días y osteogénica en $12,3 \pm 5,13$ días. (Figura 10; anexo IVa)

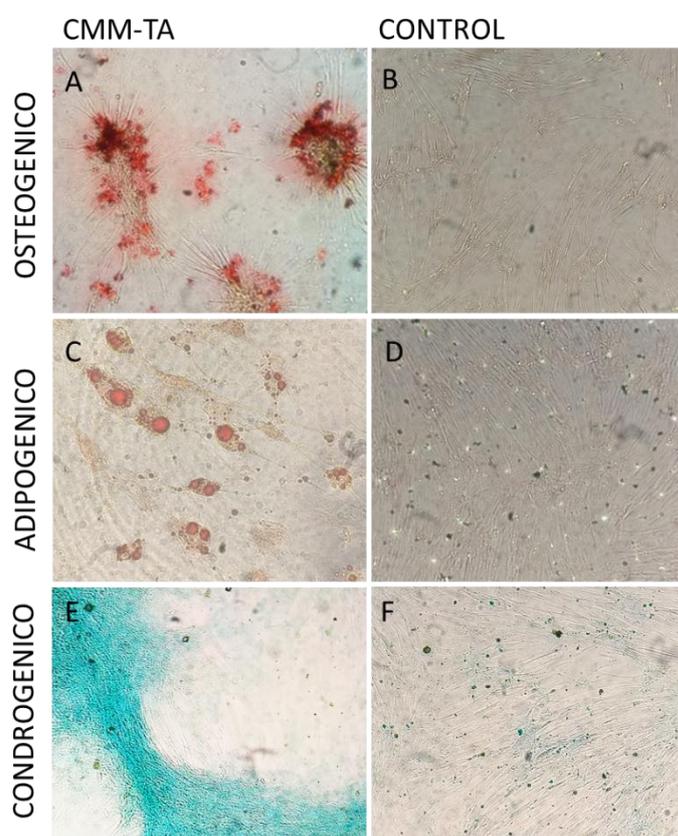


Fig. 10. Tridiferenciación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo felinas en pasaje 2.

Imágenes microscópicas de:

A) Diferenciación osteogénica teñida con Alizarin Red evidenciando depósitos de calcio (20x), C) Diferenciación adipogénica teñida con Red Oil-O evidenciando vacuolas lipídicas (40x), E) Diferenciación condrogénica teñida con Alcian Blue evidenciando formación de matriz rica en glucosaminoglucanos (10x).

B, D, y F). Controles indiferenciados (40x),

CMPD

Se sometieron a tridiferenciación 2 cultivos obteniendo una diferenciación completa en una muestra (Figura 11) y la otra muestra mostro diferenciación al linaje osteogénico y condrogénico. La diferenciación ósea se observó a los $17,6 \pm 4,49$ días, cartilaginosa a los $16,3 \pm 4,60$ días y la diferenciación adiposa a los 10 días. (Anexo IVb)

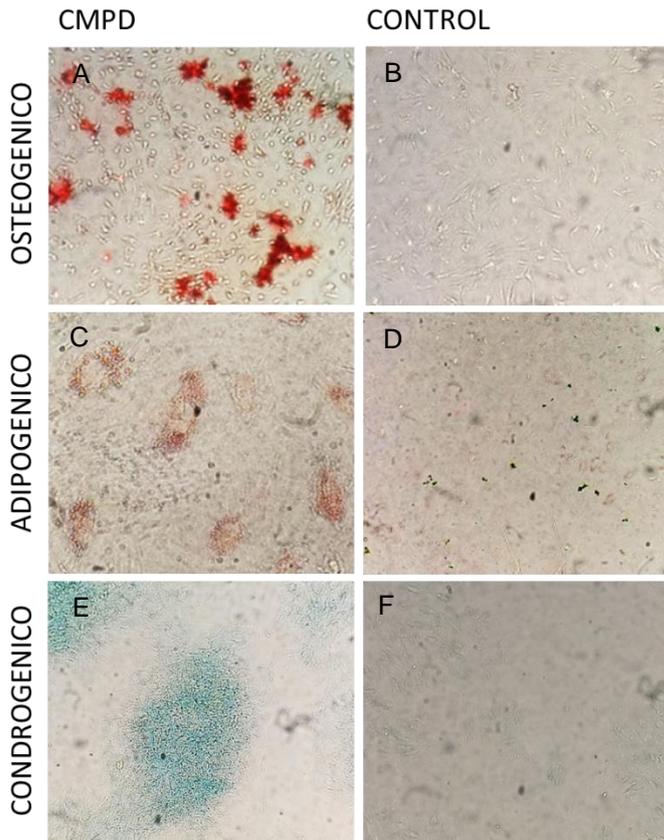


Fig. 11. Tridiferenciación de células madre de pulpa dental felina en pasaje 2.

Imágenes microscópicas de:

A) Diferenciación osteogénica teñida con Alizarin Red evidenciando depósitos de calcio (20×), C) Diferenciación adipogénica teñida con Red Oil-O evidenciando vacuolas lipídicas (40×), E) Diferenciación condrogénica teñida con Alcian Blue evidenciando formación de matriz rica en glucosaminoglucanos (10×).

B, D y F) Controles indiferenciados correspondientes (40×).

Se observó que las CMM TA diferenciaron hacia el linaje condrogénico en un tiempo significativamente menor que las CMPD y no se observó diferencia para el linaje osteogénico (Figura 12).

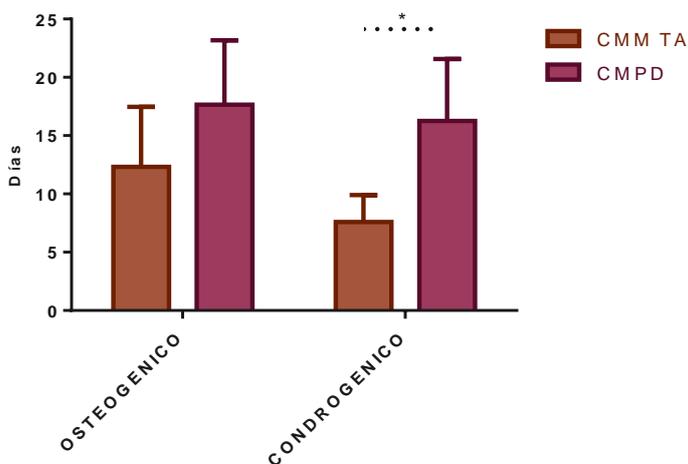


Fig. 12. Tiempo en días de cultivo hasta diferenciación osteogénica y condrogénica. Se observó una diferencia significativa (*p=0,016) entre CMM TA y CMPD para el linaje condrogénico.

5.5. Evaluación citogenética.

CMM TA

La gran mayoría de las metafases analizadas presentaron un cariotipo normal (Figura 13) excepto algunas excepciones puntuales que presentaron alteraciones numéricas y se observaron alteraciones estructurales variadas en todos los cultivos (Figura 14). En el cuadro III se resume el número de las alteraciones encontradas por pasaje. Los datos por individuo, pasaje y tipo de alteración se detallan en el anexo IV.

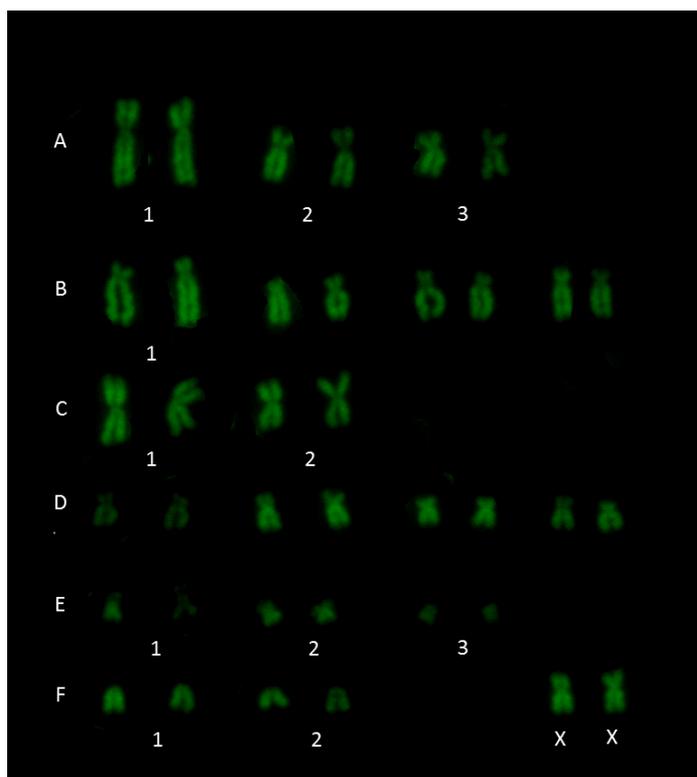


Fig. 13. Cariotipo normal $2n=38$, XX (hembra) con Bando Q de células madre mesenquimales de tejido adiposo felino. Se indica la letra correspondiente al cada grupo cromosómico y número de cada par cromosómico.

Pasaje 2: Se analizaron un total de 266 metafases de cultivos de CMM TA en pasaje 2 correspondientes a 6 individuos. De estas, 76 presentaron alguna alteración. En total se observaron 88 alteraciones. El índice mitótico promedio fue de $1.07 \pm 1.02\%$.

Se obtuvo una cantidad aproximada de 100 metafases en 2 de ellos, en 3 de ellos de 18 a 21 metafases y en un individuo, se analizaron 10 metafases.

Las alteraciones cromosómicas numéricas encontradas fueron poliploidías ($4n = 76,XXXX$) y en menor frecuencia, aneuploidía monosómica ($37,XX-E$) no clonal. Tres de los cultivos presentaron poliploidías siendo estas un 5%, 6% y 10% de las metafases analizadas en estos individuos (imagen y anexo V). Uno de ellos presentó diplocromosomas (Fig. 15).

Las alteraciones cromosómicas estructurales encontradas fueron fracturas, gaps, deleciones, duplicaciones y separaciones de cromátida, se ilustran en la figura 14. Todos los cultivos

presentaron alguna alteración siendo los gaps y las separaciones de cromátida las más frecuentes (cuadro III). Todos los grupos de cromosomas sufrieron por lo menos un tipo de alteración siendo observada la mayor cantidad de fracturas en cromosomas del grupo A y B, de gaps en el grupo B, de deleciones en el grupo A y de duplicaciones en el grupo B.

Pasaje 4: Se analizó un total de 61 metafases en pasaje 4. De 6 muestras analizadas, 2 no presentaron metafases, 2 presentaron alrededor de 20 metafases analizables ($n=17$ y 18) y 2 presentaron 12 metafases. El índice mitótico fue de $0,612 \pm 0,716\%$.

Un total de 15 metafases presentaron alguna alteración y se observó un total de 16 alteraciones. Las alteraciones numéricas encontradas fueron poliploidías (Figura 15) y una aneuploidia siendo esta una trisomía ($38,xx+1E$) la cual no fue observada en P_2 . Se observó una disminución de la cantidad de metafases poliploides con respecto al pasaje anterior en 2 cultivos. Las estructurales fueron gaps, fracturas, duplicaciones y separaciones de cromátida.

Pasaje 6: se analizaron 4 muestras. Una de ellas presentó una cantidad de alrededor de 100 metafases analizables, uno presentó una cantidad insuficiente de metafases ($n=4$) y los otros 2 presentaron una cantidad escasa de células no siendo aptos para análisis. Se cuenta con un único individuo con metafases analizables en pasaje 6. La alteración más frecuente en este individuo fue la poliploidía (7%). Se observaron también alteraciones estructurales como fracturas (5%), gaps (6%), deleciones (4%), duplicaciones (4%), separaciones de cromátida (2%) y un cromosoma en anillo (1%).

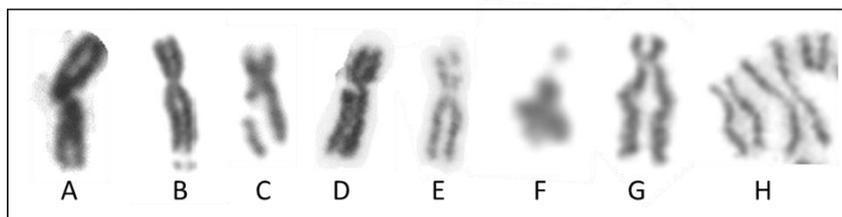


Fig. 14. Principales alteraciones cromosómicas estructurales encontradas en cultivos de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y pulpa dental. A) Fractura de cromosoma centromérica, B) Fractura de cromosoma, C y D) Fractura de cromátida, E) Gap, F) Deleción, G) Duplicación, H) Separación temprana de cromatidas

No se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de alteraciones totales entre pasaje 2 y 4, ni en el número de metafases con alguna alteración (Figura 16). No se observaron diferencias significativas por cada tipo de alteración entre el P_2 y el P_4 (Cuadro III). Sin embargo, debe considerarse que el número de metafases observadas en ambos pasajes fue notoriamente diferente. Tres líneas fueron analizadas en 2 pasajes sucesivos, se observó una disminución en el porcentaje de aberraciones entre P_2 y P_4 en 2 individuos y entre P_4 y P_6 en un individuo (anexo V) aunque las diferencias no fueron significativas.

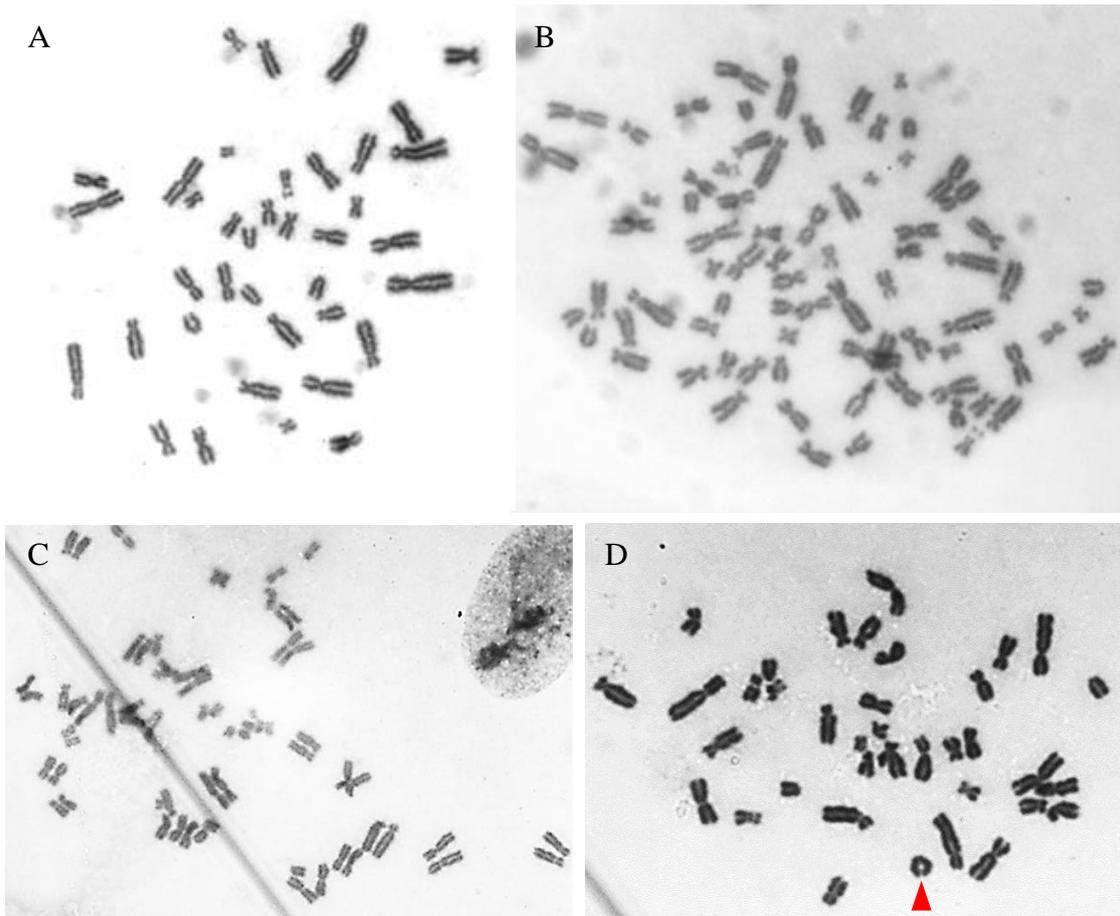


Fig. 15. Imágenes microscópicas a 100× de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. A) Metafase normal $2n=38,XX$ y B) Metafase poliploide $4n=76,XXXX$, C) Metafase poliploide incompleta con diplocromosomas, D) Cromosoma del grupo F en anillo indicado con una flecha roja.

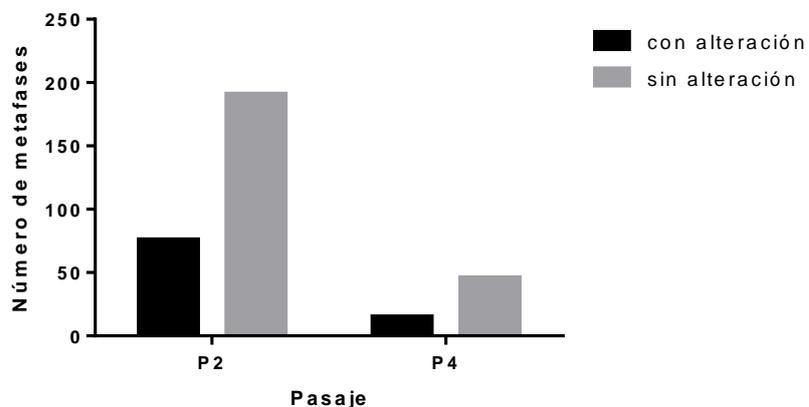


Fig. 16. Número de metafases de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo con y sin alteraciones cromosómicas en pasaje 2 y 4. No se observan diferencias significativas entre ambos pasajes ($p=0,635$)

Cuadro III. Número de alteraciones detectadas según tipo y valores de p, para células madre de tejido adiposo en los pasajes 2 y 4.

	Aneuploidias	Poliploidias	Fracturas	Gap	Deleciones	Duplicaciones	Sep. de cromátida
P2	2	17	15	16	9	13	16
P4	1	4	1	3	0	2	6
p =	0.454	1	0.321	1	0.375	1	0.26

CMPD

Se analizaron 14 metafases en pasaje 2, en cultivos de ambos individuos de las cuales 8 presentaron alguna alteración. El índice mitótico en P₂ fue de 0,10%. Se observó una trisomía del cromosoma C1 en una metafase (figura 16). En pasaje 4 se observaron 47 metafases correspondiente a un individuo, con un índice mitótico de 0,65% pero no se observaron metafases en los preparados del segundo individuo. De estas 47 metafases, 12 presentaron alguna alteración. Las alteraciones estructurales y numéricas encontradas por pasaje se muestran en el cuadro IV y se muestra una propuesta de cariotipo normal de CMPD en la figura 17. Además se observó en pasaje 4 una metafase con diplocromosomas. En pasaje 6 no se observaron metafases.

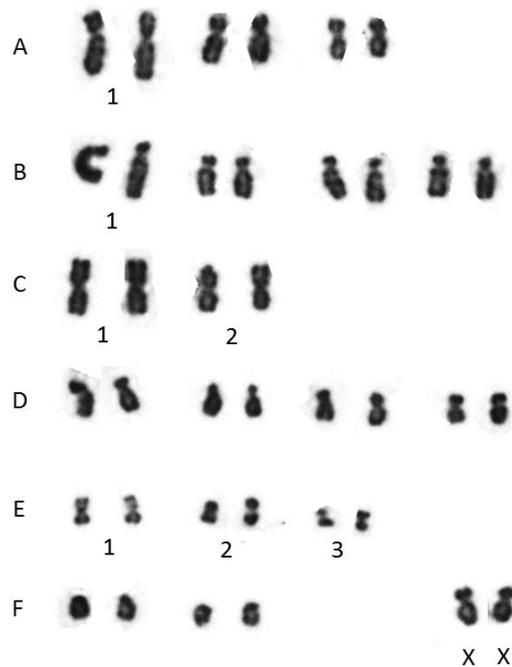


Fig. 17. Propuesta de cariotipo normal (2n=38, XX) teñido con Giemsa de células madre de pulpa dental felina de un felino hembra.

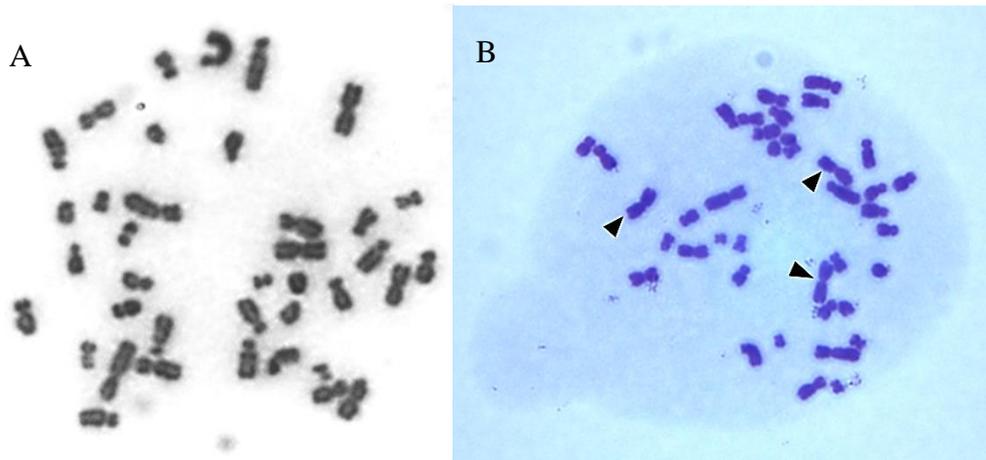


Fig. 18. Metafasas de células madre de pulpa dental (CMPD). A) Metafase normal 38, XX de CMPD, B) Trisomía del cromosoma C1 observada en P₂ (2n+C1=39) indicada con flechas negras.

Cuadro IV. Número de alteraciones detectadas según tipo para células madre de pulpa dental en los pasajes 2 y 4.

	Aneuploidias	Poliploidias	Fracturas	Gap	Deleciones	Duplicaciones	Separaciones de cromátida
P ₂	1	2	2	1	2	0	2
P ₄	0	1	4	2	1	1	3

Las CMM utilizadas en este estudio fueron integradas al biobanco de CMM del Área de Inmunología en principio con fines de investigación y los resultados preliminares fueron divulgados a la comunidad científica/profesional en la publicación Yaneselli et al. (2018) (anexo VI).

6. DISCUSIÓN

Inicialmente se planteó trabajar con grasa subcutánea pero debido al bajo volumen obtenido, se optó por trabajar con grasa intraabdominal. La cantidad de grasa obtenida (0,5 a 2g) fue similar a lo reportado por Gómez et al. (2015). Otros autores como Kim et al. (2016) utilizaron volúmenes de 25g de grasa, pero este gran volumen resulta inviable durante procedimientos quirúrgicos de rutina. El aislamiento a partir de bajas cantidades de grasa resulta menos invasivo para el donante y posibilita la extracción durante ovariectomías rutinarias. Por otro lado, se han reportado diferencias entre las propiedades de las CMM TA según el sitio de extracción. En otras especies como el canino se vio que la grasa subcutánea presentó mejor diferenciación *in vitro* que la visceral (Requicha et al., 2012; Yaneselli et al., 2018), mientras que en conejo ocurre lo contrario (Peptan et al., 2006). Sin embargo, existen reportes que muestran que no hay diferencias significativas en cuanto a proliferación o diferenciación entre ambos sitios anatómicos para la especie felina (Gómez et al., 2015).

Este trabajo describe por primera vez el aislamiento de CMPD. Hasta el momento han sido aisladas de dientes de humano (Gronthos et al., 2000), de ratones (Mina & Braut, 2004), ratas (W. Zhang et al., 2005), perros (Dissanayak et al., 2011; Iohara et al., 2013) y hurones (Homayounfar et al., 2016). En este estudio se intentó obtener pulpa dental de piezas extraídas de pacientes felinos con enfermedad periodontal avanzada, pero la extracción de pulpa dental no fue efectiva, dado que estos suelen ser pacientes gerontes, donde el canal pulpar es extremadamente fino y la cantidad de pulpa dental es mínima. Por ello se trabajó con piezas extraídas de felinos jóvenes que presentan un canal pulpar amplio ya que la apexificación se da entre 1 a 1,5 años de edad y luego comienza el estrechamiento del canal pulpar (Harvey et al., 1993). Sin embargo, en humanos fue posible aislar CMPD de dientes inflamados (Alogni et al., 2010; Werle et al., 2016).

Dado que el volumen de muestra de pulpa dental obtenido era muy pequeño, se decidió utilizar el método de explante para optimizar el rendimiento de la muestra, resultando un método de aislamiento efectivo y de bajo costo para el aislamiento de CMPD. La mayoría de los trabajos usan método enzimático (Gronthos et al., 2000; Werle et al., 2016) para el aislamiento de CMPD aunque también se describe el método por explante (Hilkens et al., 2013). El estudio de Hilkens et al. (2013) describe que no hay grandes diferencias entre la multipotencia y proliferación de las CMPD según el método de aislamiento aunque observan una diferencia significativa en cuanto al crecimiento a favor del método enzimático luego de 24 horas de cultivo. También se ha descrito que el método enzimático da lugar a una población más heterogénea que el explante, con células fusiformes, cuboidales y poligonales, probablemente porque se liberan células endoteliales, mientras que el explante permite únicamente la adherencia de células capaces de migrar (Hilkens et al., 2013; Gronthos et al., 2000).

Observamos que las CMM TA presentaron una adhesión de células a las 48-72 horas luego del plaqueo inicial y los tiempos para alcanzar el 80% de confluencia fue de aproximadamente 7 días en P₂ con un aumento paulatino en cada pasaje, similares a lo

reportado por Gómez et al. (2015). Por otro lado, las primeras CMPD se observaron a los 9 a 15 días y llegaron al 80% de confluencia a los 21 días aproximadamente.

Estas CMM TA presentaron una morfología de tipo fusiforme o triangular en los primeros pasajes coincidiendo con otros autores (Webb et al., 2011; Martin et al., 2002; Maciel et al., 2014; Clark et al., 2017) y conforme aumentan los pasajes celulares, las células se tornan más rectangulares, perdiendo su morfología fusiforme, lo cual también ha sido reportado para CMM de medula ósea felina (Maciel et al., 2014). Fueron observadas células binucleadas, más notoriamente a partir de P₄ lo cual también ha sido reportado por otros autores para CMM de medula ósea felina (Maciel et al., 2014) y también en CMM TA en equinos (Vidal et al., 2006).

En cuanto a los ensayos de proliferación celular, la mayoría de los trabajos publicados sobre CMM TA felinas utilizan un número menor o igual a 6 animales (Clark et al., 2017; Kim et al., 2017; Zajic et al., 2016). Se destaca que en el presente trabajo se utilizó un número de 9 animales en pasaje 2, aunque desafortunadamente este número no se logró mantener en los sucesivos pasajes debido a características de crecimiento de estas células. El porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas fue de un 3,5% en pasaje 2 a una concentración de siembra inicial de 110 células/cm². Gómez et al, 2015 obtuvo un porcentaje similar para CMM TA felinas, pero utilizando una siembra inicial de 2000 a 8000 células/cm² y no obtuvo formación de colonias a concentraciones menores a 1000 células/cm². Estudios anteriores intentaron expandir CMM de medula ósea felina sembrándolas a bajas densidades sin éxito, pero aumentando la concentración inicial de células se logra un aumento en la frecuencia de formación de colonias (Martin et al., 2002). Estos datos sugerirían que las células utilizadas en el presente ensayo mostraron una buena capacidad clonogénica al proliferar a densidades bajas. Sin embargo, en pasaje 4, el porcentaje de CFU-F fue menor, lo que muestra una rápida caída en la capacidad clonogénica.

En cuanto a la dinámica de proliferación, en P₄ se observó un aumento significativo en el tiempo de doblaje el cual coincide con la disminución de la capacidad clonogénica en el ensayo de CFU y una disminución de la relación núcleo citoplasma, es decir un aumento de tamaño de la célula. A su vez presentaron alteraciones nucleares y un índice mitótico menor. Únicamente 2 cultivos lograron proliferar en P₆ lo que muestra una caída importante en su capacidad proliferativa. Esto coincide con Kim et al, (2017) que observaron un incremento estable en el tiempo de doblaje poblacional acumulado hasta P₄ o P₅ y los valores de tiempo de doblaje aumentaron significativamente en los pasajes 5 y 6. También coincide con Gómez et al, (2015) quien observó que los pasajes 1 y 2 presentaban DT significativamente menor que en P₃, P₄ y P₅. En P₅ observó células senescentes y un DT de 40 a 57 días, siendo este bastante mayor al obtenido en el presente estudio, de promedio 9 días en P₄. Lee et al. (2018) realizó un estudio de propiedades de CMM TA felinas durante cultivo *in vitro* continuo en muestras de grasa de 3 individuos y no observaron diferencias significativas en la proliferación celular hasta P₄ y observaron una supresión marcada de la expansión a partir de P₅. Este mismo autor también evaluó la senescencia mediante un kit de detección de beta

galactosidasa, y observaron un 0,7% de células senescentes en P₃, y en pasaje 5 y 7 un 2,8 y 5% respectivamente. Si bien en el presente trabajo no evaluó senescencia, se observó una morfología compatible con células senescentes a partir de P₄. Las CMM TA felinas proliferaron de forma aceptable hasta P₄-P₅, mostrando una capacidad proliferativa menor que otras especies, como las CMM TA del canino (Kang et al, 2012) o el equino (Vidal et al, 2012) que proliferan hasta P₁₀. Esta característica resulta desfavorable a la hora de realizar terapias celulares en la especie felina.

Además, se observó una alteración en el crecimiento de 2 cultivos celulares con formación de acúmulos celulares y estancamiento en el crecimiento en P₃ y P₄. Este comportamiento también fue reportado por Arzi et al, 2015. Estos autores estudiaron la cinética de crecimiento de células obtenidas a partir de gatos libres de patógenos específicos (*specific pathogen free - SPF*) y gatos mascotas. En las muestras de gatos SPF observaron que los tiempos de doblaje eran de aproximadamente 2 días hasta el pasaje 4. Luego de este pasaje los DT aumentaron de forma inconsistente entre las diferentes líneas celulares. Estos autores encontraron que 5 de 9 muestras de gatos mascota formaron células gigantes multinucleadas entre P₃ a P₅ y sufrieron una detención en su proliferación. Ellos demostraron que este fenómeno se debe a la presencia y replicación activa de un retrovirus felino sin importancia clínica, el Virus Espumoso Felino (*feline foamy virus - FFV*), produciendo formación de sincitios en cultivos de células madre impidiendo su proliferación y produciendo apoptosis. En nuestro estudio se observó una morfología alterada en algunos cultivos en pasajes tempranos, similar a lo descrito por Arzi et al. (2015), por lo tanto se podría suponer que nuestros donantes estuvieran infectadas con FFV.

Esta infección dificulta la terapia autóloga con CMM en felinos y los autores también demostraron que puede realizarse serología del donante para detección de anticuerpos contra FFV como indicador de infección. Los mismos autores (Arzi et al., 2015) recomiendan congelar las CMM luego de dos pasajes celulares para obtener una mayor cantidad de células y lograr una población más homogénea. Sin embargo, ellos han alterado esta rutina y congelan pasajes 1 de CMM TA felinas, descongelando y expandiendo las células para su aplicación en P₂ o P₃ ya que no han observado alteraciones celulares anteriores a P₃. Esta estrategia permitiría el uso de células autológicas de felinos infectados con FFV.

En cuanto a la morfología de las CMPD, se observó una rel. N/C mas baja que las CMM TA, manteniendo tamaños nucleares similares y se evidenció un citoplasma muy amplio. Se deduce por lo tanto que las CMPD presentaron un mayor tamaño que las CMM TA. Además se observó una zona perinuclear de afinidad por los colorantes y una zona periférica del citoplasma con menor afinidad. Esto coincide con reportes sobre CMPD humanas, las cuales poseen a nivel ultraestructural una zona perinuclear rica en organelos con retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias que es claramente distinguido de una zona periférica pobre en organelos (Hilkens et al., 2013). Sin embargo difieren en el formato, ya que las células humanas las describen como alargadas mientras que las felinas presentaron forma más de tipo epitelioide.

La capacidad clonogénica evaluada por el ensayo de CFU-F de las CMPD felinas fue de un 9,6% de eficiencia, mientras que las de CMM TA felinas fue de 3,5% en P₂. Gronthos et al (2000) describe una formación de 20 a 77 colonias cada 1000 células sembradas de CMPD humanas, es decir un 2% a 7,7% de eficiencia. Por lo tanto, las CMPD felinas aisladas mostraron una capacidad clonogénica similar a la de CMPD humanas en pasajes tempranos utilizando la misma cantidad de células sembradas que Gronthos et al 2000. Por otro lado, nuestros resultados difieren con un estudio en perro que mostró que las CMPD caninas tenían un 17% de eficiencia de formación de colonias comparado a un 27% de las CMPD humanas (Dissanayaka et al., 2011).

Se logró la tridiferenciación de ambas fuentes de células madre confirmando su multipotencialidad y cumpliendo con los estándares de caracterización de CMM según Bourin et al, 2013 y coincidiendo con reportes anteriores para CMM TA felinas (Gómez et al. 2015; Kim et al. 2017). Por primera vez para la especie felina confirmamos la obtención de CMPD, similares a otras especies. Observamos depósitos de calcio mediante tinción con Alizarin red a los 15 días, similar a lo reportado por Werle et al. (2015). En el trabajo de Gronthos et al, 2002 vieron depósitos de calcio espaciados que se teñían con Alizarin Red a las 5 a 6 semanas de cultivo en medio de inducción ósea. Para los linajes condrogénico y adipogénico obtuvimos una diferenciación en 12 y 10 días respectivamente, siendo menor a los descrito por Werle et al. (2015) de 18 y 21 días respectivamente. Normalmente los ensayos de diferenciación culminan luego de 21 días en cultivo. La diferenciación temprana de los cultivos de CMM TA y de CMPD obtenida con el protocolo de diferenciación implementado en el presente estudio, resultó ventajoso ya que la tridiferenciación es una prueba engorrosa, costosa y al utilizarse medio sin antibiótico aumenta el riesgo de contaminación del cultivo durante este período.

Esto puede deberse a la alta concentración de ácido ascórbico utilizada que favorece el crecimiento celular. Utilizamos una concentración de ácido ascórbico de 1700 µM en el medio de inducción osteogénico mientras que lo reportado para CMM felinas y CMPD de otras especies es entre 50 y 250 µM (Pierdomenico et al., 2005; Jessica M Quimby et al., 2015; Rutigliano et al., 2013). En otras palabras, utilizamos una concentración de 10 a 30 veces mayor a la los reportes anteriores. Sin embargo, en base a lo observado durante la diferenciación *in vitro*, debe tenerse en cuenta que esta concentración de ácido ascórbico favorece la formación de cristales los cuales entorpecen la visualización al microscopio óptico.

Por otro lado, cabe resaltar el resultado positivo obtenido para la adipogénesis de CMPD ya que existen reportes de dificultad en adipogénesis que podría deberse a diferencias individuales, método de aislamiento, medios de inducción o relacionarse a la población celular heterogénea dentro de las CMPD (Yildirim, 2013). Hay antecedentes de CMM TA felinas de disminución de marcadores de diferenciación adipogénica y osteogénica en P₅ (Lee et al., 2018). Si bien, el presente estudio evaluó únicamente la tridiferenciación en P₂, de acuerdo a los resultados de proliferación y morfología de CMM TA en P₄ sería esperable encontrar una reducción en la capacidad de tridiferenciación.

El presente trabajo es el primer estudio de estabilidad *in vitro* de las CMM felinas a lo largo de los pasajes celulares 2 y 4. Se analizaron cultivos de CMM TA de 6 felinos en pasaje 2 con un total de 266 metafases y 4 felinos en pasaje 4 con un total de 61 metafases encontrándose signos de inestabilidad. No se observó un aumento de las aberraciones cromosómicas entre P₂ y P₄ para CMM TA. Los más afectados fueron los cromosomas de mayor tamaño en el cariotipo felino, los grupos A y B. La disminución en la cantidad de metafases encontrada en pasajes elevados para CMM TA coincide con el aumento en los tiempos de doblaje de las células en P₄, lo cual muestra la disminución de su capacidad proliferativa como se comentó anteriormente. El bajo número de metafases obtenido en pasaje 6 coincide con las alteraciones morfológicas observadas, compatibles con senescencia. Solamente un individuo presentó metafases suficientes en P₆, por lo que P₆ no fue considerado para el análisis final entre pasajes.

Uno de los principales requisitos de cualquier terapia celular es su seguridad. La ISCT establece como parámetro que 2 metafases anormales idénticas de 20 analizadas (10%) debe ser usado como límite de exclusión para uso clínico de CMM humanas (Barkholt et al., 2013). Los antecedentes sobre control de estabilidad de CMM TA felinas existentes son el trabajo de Clark et al. (2017) y Villatoro et al. (2018) quienes realizan un control citogenético de CMM TA en un único pasaje pero no se realiza un seguimiento a lo largo del cultivo. Clark et al. (2017) compara las CMM TA felinas con las CMM TA humanas analizando un número de 2 felinos en P₅ y Villatoro et al. (2018) realizó un cariotipado a modo de control de cultivos en P₂ para aplicar en terapia celular para queratitis eosinofílica en felinos. Ambos autores analizaron un mínimo de 7 metafases obteniendo cariotipos normales. Para medicina veterinaria no hay criterios definidos por lo cual que se tomó como referencia para el presente ensayo aquellos establecidos para humano. En el presente ensayo, si bien algunos cultivos superaron ampliamente las 20 metafases buscadas, otros no alcanzaron esta cantidad lo cual dificultó el análisis de datos. Dada la dificultad que presenta obtener un número de metafases aceptable sin uso de estimulantes de mitosis y la disminución de proliferación en los subsiguientes pasajes de CMM TA se tomaron en cuenta cultivos con menos de 20 metafases analizables. Se realizó el análisis sobre el total de metafases por pasaje y se consiguió comparar 3 cultivos que lograron metafases aceptables en sucesivos pasajes. Esta dificultad de obtención de metafases ha sido reportada también por otros autores para CMM humanas, (Muntión et al., 2012; Stultz et al., 2016) e incluso algunos estudios trabajan con un número de 10 metafases en humanos (Duailibi et al., 2012).

Realizamos un ensayo piloto utilizando tiempos más bajos de 1, 2 y 3 horas de incubación con Colcemid, obteniendo los mejores resultados a las 2 horas coincidiendo con otros autores (Clark et al. 2017). Se destaca que obtuvimos 100 metafases analizables en algunos individuos aunque debe considerarse que los factores de variabilidad asociados al individuo también pueden influir en estos resultados. Existe un estudio de optimización de cariotipo en CMM de medula ósea (Muntión et al. 2012) en donde probaron distintos tiempos y concentraciones de colcemid, obteniendo el mayor número de metafases con 0.05ug/ml de colcemid durante 15 horas incubado toda la noche, donde visualizaron un máximo de 70 metafases analizables. En otro estudio, menos de 1 hora de inhibición mitótica no dio un número aceptable de metafases mientras que más de 6 horas afectó la calidad de los cromosomas (Borgonovo et al. 2014). En base a esto, un ensayo de incubación larga podría

compensar la baja tasa de crecimiento observada en P₄ y P₆ e intentar aumentar el número de metafases en pasajes avanzados.

No se observó una variación significativa en la cantidad de alteraciones entre P₂ y P₄ lo cual sugiere la estabilidad de las CMM TA entre estos pasajes. Si bien las diferencias no fueron significativas, en los cultivos analizados de forma sucesiva, se observó un porcentaje menor de aberraciones cromosómicas en P₄ con respecto a P₂, lo cual también ha sido reportado por Stultz et al. (2016) quien observó una disminución de aberraciones a partir de P₃ y P₅. Esta disminución de alteraciones a medida que se avanza en los cultivos celulares podría explicarse por un ajuste de las CMM a las condiciones de cultivo habiendo una tendencia a perder cariotipos anormales a medida que aumentan los pasajes celulares, posiblemente por apoptosis o senescencia causada por mutaciones genéticas deletéreas (Stultz et al., 2016). Esta falta de habilidad replicativa de cariotipos aberrantes sugiere que no presentarían riesgo de tumorigénesis (Binato et al., 2013; Stultz et al., 2016). Lo que observamos en este estudio y lo observado por Stultz et al. (2016) se opone a las dos teorías sobre la presencia de células madre mesenquimales transformadas en un cultivo planteada por Wang et al. (2005), una sugiere que las células anormales presentes en baja frecuencia en la muestra de tejido del donante se expanden durante el cultivo *in vitro* o sino la segunda teoría sugiere la transformación de las células durante el cultivo *in vitro*.

En este estudio observamos que la poliploidía fue la alteración numérica más frecuente pero se dieron en cultivos puntuales y disminuyeron su proporción en los siguientes pasajes, nuevamente concordando con Stultz et al, (2016). Hay estudios de CMM de mucosa gingival humana que observan un 3% de metafases poliploides que se mantuvo invariable a lo largo de los pasajes. Estas pueden ser un signo de inmortalización de un cultivo lo cual resultaría desfavorable para un cultivo de CMM con perspectivas terapéuticas (Nikitina et al., 2018). Se observó aneuploidía monosómica (38,XX-E) en un individuo particular en 2 de 100 metafases aunque esta debería ser confirmada mediante técnicas de identificación cromosómica para saber si se trata de una alteración clonal o simplemente una pérdida del cromosoma debido a la técnica de preparación. Sin embargo, la alteración no se mantuvo en el siguiente pasaje por lo cual se consideró como no clonal. También observamos una trisomía en P₄, aunque no pudimos confirmar si se mantuvo en los siguientes pasajes, pero se consideró como no clonal por encontrarse únicamente en una célula de las 19 examinadas. Esto difiere con lo encontrado en CMM de medula ósea humanas (Stultz et al., 2016) o de CMPD humana (Duailibi et al., 2012), donde la alteración más frecuente fue la aneuploidía. Generalmente los estudios citogenéticos reportados son en roedores y humanos. Es posible suponer que el tipo de alteraciones dependa de la fuente y que varíe entre distintas especies. Según la nomenclatura citogenética internacional, en caso de pérdida de cromosoma, esta debe estar presente en 3 células para considerarse clonal (ISCN-2013, sección 11, "Neoplasia"), por lo que los cultivos analizados en este estudio, si bien no se realizó identificación cromosómica específica, no se observaron alteraciones numéricas de forma reiterada.

Sin duda el número de metafases analizadas en P₂ para las CMPD no es suficiente para realizar un análisis concluyente y solo una muestra pudo ser analizada en P₄ y únicamente se analizaron 2 individuos. Sin embargo, se observaron el mismo tipo de alteraciones estructurales que en las CMM TA. La trisomía observada en P₂ fue en una única metafase pero no puede definirse su clonalidad dado el escaso número de metafases analizado en P₂ y que únicamente se observaron 4 metafases en P₄ del mismo donante. Existen antecedentes en CMPD humanas que reportan inestabilidad *in vitro* con presencia de aneuploidias (Duailibi et al. 2012). No se observaron metafases en P₆ a pesar de que en las pruebas de proliferación estos cultivos demostraron mantener su capacidad clonogénica. Sin embargo, el tiempo de doblaje aumentó, lo cual implica una reducción en el índice mitótico y por lo tanto en la cantidad de metafases. Es posible que el tiempo de Colcemid utilizado no sea suficiente en estos pasajes con tiempo de doblaje elevado y a ello se deba la falta de metafases observada, necesitándose una adaptación en los tiempos de Colcemid como se mencionó para CMM TA.

En este estudio no encontramos alteraciones numéricas preocupantes en las células de ambas fuentes, aunque sí algunos signos de inestabilidad estructural. En el presente estudio utilizamos tripsina para cosechar las células. Se ha visto que las células que son levantadas mediante métodos enzimáticos muestran mayor cantidad de aberraciones que aquellas cosechadas mediante métodos mecánicos (Mitalipova et al., 2005). También los altos porcentajes de oxígeno o alta concentración de glucosa puede aumentar las anormalidades cromosómicas debido a estrés oxidativo (Forsyth et al., 2006; Rebuzzini et al., 2008). Además, existe una variabilidad individual relacionada al donante en la estabilidad genética de las CMM.

La mayoría de los trabajos sugiere que las CMM presentan cariotipos estables (Bernardo et al., 2007; Blázquez-Prunera et al. 2017; Clark et al., 2017) algunos muestran inestabilidad genética (Stultz et al., 2016; Duailibi et al., 2012), algunas publicaciones mostraron malignización celular durante el cultivo aunque fueron retractados, debido a contaminación cruzada con líneas celulares cancerosas e imposibilidad de repetir los resultados (de la Fuente et al., 2010; Garcia et al., 2010; Rubio et al., 2005), poniendo de manifiesto la controversia que existe en este tópico. Al día de hoy, solamente existe un único reporte de transformación espontánea de CMM en cultivos de largo plazo (Pan et al, 2014). Estas células alteradas mostraron tumorigénesis al ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos, a diferencia de las CMM con comportamiento normal. Este estudio no ha sido comprobado aún por otros autores. Otros autores han realizado estudios similares con CMM TA inyectadas en ratones inmunodeficientes y seguimiento de un año, sin formación de tumores (MacIsaac et al, 2012). Estas pruebas de malignización suelen ser realizadas en animales inmunodeficientes, donde existe una falta de control orgánico, omitiendo la existencia de un sistema inmune regulador de los procesos celulares lo cual podría justificar la malignización observada en estos modelos. Por otro lado, las anormalidades cromosómicas existen a nivel de cultivo pero la transformación tumoral completa no se alcanza en el cultivo y no necesariamente se asocia a expansión clonal o ventajas a nivel del cultivo (Wagner et al, 2012). La transformación oncológica puede darse sin inestabilidad genética. Se han

observado clonas anormales recién a partir de pasaje 10 en CMM y estos no mostraron ventajas en el crecimiento (Roselli et al, 2012). Por ello, algunos autores recomiendan una interpretación cautelosa de los resultados de citogenética (Sensebé et al, 2012). Las alteraciones celulares y de senescencia celular afectan el potencial terapéutico de las células por lo cual es recomendable reducir la expansión celular al mínimo, incluso alguno autores hablan de no exceder un máximo de 4 pasaje celulares (Torre et al, 2015) para aplicación clínica. Aunque, no hay evidencia sólida de transformación *in vitro* de CMM y la mayoría de las anormalidades llevan a la senescencia celular, algunos autores aun recomiendan hacer un análisis de estabilidad genética como método de control pre clínico (Neri et al, 2019).

7. CONCLUSIONES

Con respecto a las CMPD:

- a) Se realizó el primer aislamiento y expansión *in vitro* de CMPD felinas, por método de explante.
- b) Se comprobó su capacidad clonogénica en P₂, P₄, P₆ y su capacidad de multipotencialidad *in vitro* en P₂.
- c) Su capacidad proliferativa se mantiene a lo largo del cultivo, pero aumenta el tiempo de doblaje progresivamente en los sucesivos pasajes.
- d) Mostraron signos de inestabilidad cromosómica, aunque el número total de metafases analizadas fue reducido y no permite realizar conclusiones sobre su estabilidad.

Con respecto a las CMM TA:

- a) Se logró aislar y expandir CMM TA felinas mediante método enzimático.
- b) Se comprobó su capacidad clonogénica en sucesivos pasajes y su multipotencialidad en P₂.
- c) Se observó que disminuyen su capacidad de proliferación a partir de P₄, mostrando alteraciones morfológicas.
- d) Se observaron signos de inestabilidad cromosómica estructural, pero estas no aumentaron entre pasajes sucesivos.

8. PERSPECTIVAS

Puesta a punto de la detección de FFV mediante PCR en las CMM criopreservadas para correlacionar la posible presencia viral con los resultados de proliferación, para seleccionar los donantes de TA de manera de ahorrar recursos ya que hay evidencias de que la presencia de este virus dificulta la expansión celular.

Detectar el genoma viral de VIF y ViLeF en las CMM felinas ya que no hay estudios que demuestren si estos pueden infectar o no las CMM.

Aumentar el número de muestras de CMPD felinas y de metafases para análisis de estabilidad para así poder hacer comparaciones estadísticas que permitan realizar una evaluación concluyente y la potencial publicación de un artículo científico.

Buscar expresión génica de marcadores específicos de diferenciación mediante técnicas moleculares en ambas fuentes.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, J. D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D. S., & Giordano, F. J. (2004). Stromal cell–derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 110(21), 3300–3305.
2. Afonso Cornélio, D., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2014). Genetic evaluation of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 36(4), 238–240. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.05.014>
3. Aimetti, M., Ferrarotti, F., Gamba, M., Giraudi, M., & Romano, F. (2018). Regenerative Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using Autologous Dental Pulp Stem Cells: A 1-Year Follow-Up Case Series. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 38(1), 51–58. <https://doi.org/10.11607/prd.3425>.
4. Alongi, D. J., Yamaza, T., Song, Y., Fouad, A. F., Romberg, E. E., Shi, S., Tuan, R., Huang, G. T.-J. (2010). Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. [Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Rme.10.30](http://Dx.Doi.Org/10.2217/Rme.10.30).
5. Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, 32(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>
6. Arzi, B., Clark, K. C., Sundaram, A., Spriet, M., Verstraete, F. J. M., Walker, N. J., Loscar, M., Fazel, N., Murphy, W., Vapniarsky, N., Borjesson, D. L. (2017). Therapeutic Efficacy of Fresh, Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Feline Chronic Gingivostomatitis. *STEM CELLS Translational Medicine*, 6(8), 1710–1722. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0035>
7. Arzi, B., Mills-Ko, E., Verstraete, F. J. M., Kol, A., Walker, N. J., Badgley, M. R., William, N., Murphy, W., Vapniarsky, N., Borjesson, D. L. (2016). Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(1), 75–86. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0127>
8. Arzi, B., Kol, A., Murphy, B., Walker, N. J., Wood, J. A., Clark, K., Verstraete, Frank J M., Borjesson, D. L. (2015). Feline foamy virus adversely affects feline mesenchymal stem cell culture and expansion: implications for animal model development. *Stem Cells and Development*, 24(7), 814–823. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0317>
9. 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(4), 412–422. <https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2006.12.447>
10. Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Franco, A., Borgogni, E., Frontera, S., Nesi, G., Liotta, F., Luchese, M., Perigli, G., Francini, F., Froti, G., Sergio, M., Luconi, M (2012). Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS ONE*, 7(May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036569>

11. Baker, D. E. C., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H., Andrews, P. W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nature Biotechnology*, 25(2), 207–215. <https://doi.org/10.1038/nbt1285>
12. Barkholt, L., Flory, E., Jekerle, V., Lucas-samuel, S., Ahnert, P., Bisset, L., Büscher, D., Fibbe, W., Foussat, A., Kwa, M., Lantz, O., Ciulaitis, R M A., Schneider, C., Senseb, L., Erard, G., Tarte, K., Tosca, L., Salmikangas, P. (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell e based therapies — Bridging scienti fi c observations and regulatory viewpoints, (March). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
13. Bernardo, M. E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A. M., Avanzini, M. A., Moretta, A., Montagna, D., Maccario, R., Villa, R., Daidone, M G., Zuffardi, O., Locatelli, F. (2007). Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer Research*, 67(19), 9142–9149. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4690>
14. Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
15. Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *The Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98–103. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
16. Blázquez-Prunera, A., Díez, J. M., Gajardo, R., & Grancha, S. (2017). Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0552-z>
17. Bolognesi, C., Roggieri, P., Ropolo, M., Thomas, P., Hor, M., Fenech, M., Nersesyan, A., Knasmueller, S. (2015). Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*, 30(4), 545-55. doi: 10.1093/mutage/gev017.
18. Boomsma, R. A., & Geenen, D. L. (2012). Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PloS One*, 7(4), e35685.
19. Bootcha, R., Temwichitr, J., & Petchdee, S. (2015). Intra-articular injections with allogeneic dental pulp stem cells for chronic osteoarthritis. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(1), 131–139.
20. Borgonovo, T., & Vaz, I. (2014). Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 36(3), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.006>
21. 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(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
22. Brólio, M. P., Vidane, A. S., Zomer, H. D., Wenceslau, C. V, Ozório, J. J., Martins, D. S., Ambrósio, C. E. (2012). Morphological characterization of the progenitor blood cells in canine and feline umbilical cord. *Microscopy Research and Technique*, 75(6), 766–770. <https://doi.org/10.1002/jemt.21123>
 23. Bronzi, D., Bramanti, V., Tomassoni, D., Laureanti, F., Grasso, S., Volsi, G. L., & Avola, R. (2010). Neural Markers Expression in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Cultures Treated with Neurosteroids. *Neurochemical Research*, 35(12), 2154–2160. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0283-3>
 24. Bruel A, Christensen E, Trandum-Jensen Qvortup K, Geneser F. (2014) *Geneser Histología*. Ed. Médica Panamericana, 4ª ed. Cap. 9, pp. 227-232
 25. Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
 26. Carinci, F., Papaccio, G., Laino, G., Palmieri, A., Brunelli, G., D’Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Scapoli, L., Martinelli, M., Pezzetti, F. (2008). Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 19(3), 616–625; discussion 626-7. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31816aabc8>
 27. Carrade, D. D., & Borjesson, D. L. (2013). Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comparative Medicine*, 63(3), 207–217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759523>
 28. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G., & Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS One*, 3(4), e1886.
 29. Clark, K. C., Fierro, F. A., Ko, E. M., Walker, N. J., Arzi, B., Tepper, C. G., Dahleburg, H., Cicchetto, A., Kol, A., Marsh, L., Murphy, W., Fazel, N., Borjesson, D. L. (2017). Human and feline adipose-derived mesenchymal stem cells have comparable phenotype, immunomodulatory functions, and transcriptome. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0528-z>
 30. d’Aquino, R., De Rosa, A., Laino, G., Caruso, F., Guida, L., Rullo, R., Checchi, V., Laino, L., Tirini, V., Papaccio, G. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 312B(5), 408–415. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21263>
 31. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
 32. da Silva Meirelles, L., Sand, T. T., Harman, R. J., Lennon, D. P., & Caplan, A. I. (2009). MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Engineering. Part A*, 15, 221–229. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0103>
 33. de la Fuente, R., Bernad, A., Garcia-Castro, J., Martin, M. C., & Cigudosa, J. C. (2010). Retraction: Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Research*, 70(16), 6682–6682. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2451>

34. Demircan, P. C., Sariboyaci, A. E., Unal, Z. S., Gacar, G., Subasi, C., & Karaoz, E. (2011). Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy*, 13(10), 1205–1220. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.605351>
35. Devireddy, L. R., Boxer, L., Myers, M. J., Skasko, M., & Screven, R. (2017). Questions and Challenges in the Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Based Therapies in Veterinary Medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23(5), 462–470. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0451>
36. Dissanayaka, W. L., Zhu, X., Zhang, C., & Jin, L. (2011). Characterization of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Canine Premolars. *Journal of Endodontics*, 37(8), 1074–1080. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.04.004>
37. Duailibi, M. T., Kulikowski, L. D., Duailibi, S. E., Lipay, M. V. N., Melaragno, M. I., Ferreira, L. M., ... Yelick, P. C. (2012). Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. *Journal of Molecular Histology*, 43(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9373-z>
38. Duesberg, P., Li, R., Fabarius, A., & Hehlmann, R. (2006). Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contributions to Microbiology*, 13, 16–44. <https://doi.org/10.1159/000092963>
39. Elizabeth M. Lund; P. Jane Armstrong; Claudia A. Kirk;, & Linda M. Kolar; Jeffrey S. Klausner. (1999). Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 214(9), 1336–1341. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Claudia_Kirk/publication/12979832_Health_status_and_population_characteristics_of_dogs_and_cats_examined_at_private_veterinary_practices_in_the_United_States/links/09e415092b1ebd5beb000000.pdf
40. Emily, P. (1998). Endodontic diagnosis in dogs. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 28(5), 1189–1202, vii. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(98\)50109-x](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(98)50109-x)
41. Forsyth, N. R., Musio, A., Vezzoni, P., Simpson, A. H. R. W., Noble, B. S., & McWhir, J. (2006). Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning and Stem Cells*, 8(1), 16–23. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.8.16>
42. Fortier, L. A. (2005). Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>
43. 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 Proliferation*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
44. Gandia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., Sepúlveda, P. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(3), 638–645. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0484>

45. Garcia, S., Bernad, A., Martín, M. C., Cigudosa, J. C., Garcia-Castro, J., & de la Fuente, R. (2010). Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 316(9), 1648–1650. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.016>
46. Gardel, L., Rada, T., Gomes, M., Reis, R., & Serra, L. (2010). A regenerative medicine approach for the treatment of large gap on bone fracture in the cat using mesenchymal stem cells : a case report, 2010.
47. Gomes, J. Á. P., Geraldés Monteiro, B., Melo, G. B., Smith, R. L., Cavenaghi Pereira da Silva, M., Lizier, N. F., Kerkis, I. (2010). Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(3), 1408. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4029>
48. Gómez, M. C., Qin, Q., Biancardi, M. N., Galiguis, J., Dumas, C., MacLean, R. A., Wang, G., Pope, C. E. (2015). Characterization and Multilineage Differentiation of Domestic and Black-Footed Cat Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Abdominal and Subcutaneous Adipose Tissue. *Cellular Reprogramming*, 17(5), 376–392. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0040>
49. Gorrel, C. (2006) Anatomía del diente y del periodonto. En: *Odontología veterinaria en la práctica veterinaria*. Ed. Servet. Zaragoza, Cap 4, pp29.
50. Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, O, Robey, P.G., Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535. <https://doi.org/10.1177/154405910208100806>
51. Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
52. Harvey, C., Emili, P. (1993) Endodontics. En: *Small Animal Dentistry*. Ed. Mosby, Unated States of America, Cap 6, pp156-212.
53. Hoffman, A. M., & Dow, S. W. (2016). Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *STEM CELLS*, 34(7), 1709–1729. <https://doi.org/10.1002/stem.2377>
54. Homayounfar, N., Verma, P., Nosrat, A., El Ayachi, I., Yu, Z., Romberg, E., Fouad, A. F. (2016). Isolation, Characterization, and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells in Ferrets. *Journal of Endodontics*, 42(3), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.002>
55. Huang, A. H.-C., Snyder, B. R., Cheng, P.-H., & Chan, A. W. S. (2008). Putative Dental Pulp-Derived Stem/Stromal Cells Promote Proliferation and Differentiation of Endogenous Neural Cells in the Hippocampus of Mice. *STEM CELLS*, 26(10), 2654–2663. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0285>
56. Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>

57. Hung, S., Pochampally, R. R., Chen, S., Hsu, S., & Prockop, D. J. (2007). Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K-Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis. *Stem Cells*, 25(9), 2363–2370.
58. Iacono, E., Cunto, M., Zambelli, D., Ricci, F., Tazzari, P. L., & Merlo, B. (2012). Could fetal fluid and membranes be an alternative source for mesenchymal stem cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. *Veterinary Research Communications*, 36(2), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s11259-012-9520-3>
59. Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., Ohgushi, H. (2008). Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 76(5), 495–505. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00245.x>
60. Iohara, K., Murakami, M., Takeuchi, N., Osako, Y., Ito, M., Ishizaka, R., Nakashima, M. (2013). A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(7), 521–533. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0132>
61. Iohara, K., Zheng, L., Wake, H., Ito, M., Nabekura, J., Wakita, H., Nakashima, M. (2008). A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp. *Stem Cells*, 26(9), 2408–2418. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0393>
62. Ishikawa, T., Banas, A., Hagiwara, K., Iwaguro, H., & Ochiya, T. (2010). Stem Cells for Hepatic Regeneration: The Role of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5(2), 182–189. <https://doi.org/10.2174/157488810791268636>
63. Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Calenic, B., Nakahara, T., Ishikawa, H., Mitiev, V., & Haapasalo, M. (2010). Deciduous and Permanent Dental Pulp Mesenchymal Cells Acquire Hepatic Morphologic and Functional Features In Vitro. *Journal of Endodontics*, 36(3), 469–474. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2009.12.022>
64. Ito, K., Yamada, Y., Nakamura, S., & Ueda, M. (2011). Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 26(5), 947–954. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010075>
65. Kang, B.-J., Ryu, H.-H., Park, S. S., Koyama, Y., Kikuchi, M., Woo, H.-M., 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(3), 299–310. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000587>
66. Karnieli, O., Izhar-Prato, Y., Bulvik, S., & Efrat, S. (2007). Generation of Insulin-Producing Cells from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Genetic Manipulation. *Stem Cells*, 25(11), 2837–2844. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0164>
67. Karp, J. M., & Leng Teo, G. S. (2009, March 6). Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>

68. Kerkis, I., Ambrosio, C. E., Kerkis, A., Martins, D. S., Zucconi, E., Fonseca, S. A. S. Zatz, M. (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *Journal of Translational Medicine*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-35>
69. Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G. C., Gomes Massironi, S. M., Pereira, L. V, Cerruti, H. F. (2006). Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells, Tissues, Organs*, 184(3–4), 105–116. <https://doi.org/10.1159/000099617>
70. 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(5), 1294–1301.
71. Khosrotehrani, K. (2013). Mesenchymal stem cell therapy in skin: why and what for? *Experimental Dermatology*, 22(5), 307–310.
72. Kim, H.-R., Lee, J., Byeon, J. S., Gu, N.-Y., Lee, J., Cho, I.-S., & Cha, S.-H. (2016). Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27456770>
73. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., & Epstein, S. E. (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, 94(5), 678–685.
74. Książek, K. (2009). A Comprehensive Review on Mesenchymal Stem Cell Growth and Senescence. *Rejuvenation Research*, 12(2), 105–116. <https://doi.org/10.1089/rej.2009.0830>
75. Lamm, N., Ben-David, U., Golan-Lev, T., Storchová, Z., Benvenisty, N., & Kerem, B. (2016). Genomic Instability in Human Pluripotent Stem Cells Arises from Replicative Stress and Chromosome Condensation Defects. *Cell Stem Cell*, 18(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.003>
76. 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 <i>in vitro</i> cultivation. *Journal of Veterinary Medical Science*. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0563>
77. Liu, L., Wei, X., Ling, J., Wu, L., & Xiao, Y. (2011). Expression Pattern of Oct-4, Sox2, and c-Myc in the Primary Culture of Human Dental Pulp Derived Cells. *Journal of Endodontics*, 37(4), 466–472. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2010.12.012>
78. Lucaciu, O., Sorițău, O., Gheban, D., Ciuca, D. R., Virtic, O., Vulpoi, A., Crisan, B. (2015). Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. *BMC Biotechnology*, 15, 114. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0229-6>
79. MacIsaac, Z.M., Shang, H., Agrawal, H., Yang, N., Parker, A., Katz, A.J. (2012). Long- term in vivo tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells. *Experimental Cell Research*, 318(4), 416-423.

80. 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. *Experimental Hematology*, 30(8), 879–886. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00864-0](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00864-0)
81. Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., & Scheven, B. A. (2017). Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. *STEM CELLS*, 35(1), 61–67. <https://doi.org/10.1002/stem.2398>
82. Meisner, L. F., & Johnson, J. A. (2008). Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, 45(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.005>
83. Mina, M., & Braut, A. (2004). New Insight into Progenitor/Stem Cells in Dental Pulp Using Colla1-GFP Transgenes. *Cells Tissues Organs*, 176(1–3), 120–133. <https://doi.org/10.1159/000075033>
84. Mitalipova, M. M., Rao, R. R., Hoyer, D. M., Johnson, J. A., Meisner, L. F., Jones, K. L., Stice, S. L. (2005). Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23(1), 19–20. <https://doi.org/10.1038/nbt0105-19>
85. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
86. Morsczeck, C., Moehl, C., Götz, W., Heredia, A., Schäffer, T. E., Eckstein, N., Hoffmann, K. H. (2005). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biology International*, 29(7), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.03.020>
87. Mumaw, J. L., Schmiedt, C. W., Breidling, S., Sigmund, A., Norton, N. A., Thoreson, M., Hurley, D. J. (2015). Feline mesenchymal stem cells and supernatant inhibit reactive oxygen species production in cultured feline neutrophils. *Research in Veterinary Science*, 103, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.010>
88. Muntión, S., Sánchez-Guijo, F. M., Carrancio, S., Villarón, E., López, O., Diez-Campelo, M., del Cañizo, M. C. (2012). Optimisation of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implications for clinical use. *Transfusion Medicine*, 22(2), 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01134.x>
89. Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Dembinski, J. (2005). Human bone marrow–derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, 65(8), 3307–3318.
90. Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Arijji, Y., & Matsushita, K. (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0506-5>
91. NNCI, Antonio. *Ten Cate Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

92. Neri, S. (2019). Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102406>
93. Neri, S., Bourin, P., Peyrafitte, J.-A., Cattini, L., Facchini, A., & Mariani, E. (2013). Human Adipose Stromal Cells (ASC) for the Regeneration of Injured Cartilage Display Genetic Stability after In Vitro Culture Expansion. *PLoS ONE*, 8(10), e77895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077895>
94. Nikitina, V., Astrelina, T., Nugis, V., Ostashkin, A., Karaseva, T., Dobrovolskaya, E., Samoilov, A. (2018). Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS ONE*, 13(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192445>
95. O'Neill, D. G., Church, D. B., McGreevy, P. D., Thomson, P. C., & Brodbelt, D. C. (2014). Prevalence of disorders recorded in cats attending primary-care veterinary practices in England. *Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.08.004>
96. Oberbauer, E., Steffenhagen, C., Wurzer, C., Gabriel, C., Redl, H., & Wolbank, S. (2015). Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regeneration*, 4(1), 4:7. <https://doi.org/10.1186/s13619-015-0020-0>
97. Pan, Q., Fouraschen, S. M., de Ruiter, P. E., Dinjens, W. N., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., & van der Laan, L. J. (2014). Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Experimental Biology and Medicine*, 239(1), 105–115. <https://doi.org/10.1177/1535370213506802>
98. Parys, M., Kruger, J. M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2017). Evaluation of immunomodulatory properties of feline mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, scd.2016.0041. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0041>
99. Peptan, I. A., Hong, L., & Mao, J. J. (2006). Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(5), 1462–1470. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000206319.80719.74>
100. Pereira, L. O., Rubini, M. R., Silva, J. R., Oliveira, D. M., Silva, I. C. R., Poças-Fonseca, M. J., & Azevedo, R. B. (2012). Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *International Endodontic Journal*, 45(12), 1080–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02068.x>
101. Phinney, D. G., & Pittenger, M. F. (2017). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *STEM CELLS*, 35(4), 851–858. <https://doi.org/10.1002/stem.2575>
102. Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Bagnara, G. P. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80(6), 836–842. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210973>
103. Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De Biasi, S., Gibellini, L., De Pol, A. (2015). Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Developmental Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12861-015-0065-x>

104. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
105. Powell, R. H., Galiguis, J., Biancardi, M. N., Pope, C. E., Leibo, S. P., Wang, G., & Gomez, M. C. (2016). Phenotypic and Molecular Characterization of Domestic Cat (*Felis catus*) Spermatogonial Stem Cells. *Biology of Reproduction*, 95(1), 20–20. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134635>
106. 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. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 204(3), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.007>
107. Quimby, Jessica M, & Borjesson, D. L. (2018). Mesenchymal stem cell therapy in cats: Current knowledge and future potential. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(3), 208–216. <https://doi.org/10.1177/1098612X18758590>
108. Quimby, Jessica M, Webb, T. L., Gibbons, D. S., & Dow, S. W. (2011). Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13(6), 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2011.01.005>
109. Quimby, Jessica 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 Research & Therapy*, 4(2), 48. <https://doi.org/10.1186/scrt198>
110. Quimby, Jessica M, Webb, T. L., Randall, E., Marolf, A., Valdes-Martinez, A., & Dow, S. W. (2015). Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. <https://doi.org/10.1177/1098612X15576980>
111. Rebelatto, C. K., Aguiar, a M., Moretão, M. P., Senegaglia, a C., Hansen, P., Barchiki, F., ... Correa, a. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 233(7), 901–913. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-356>
112. Rebuzzini, P., Neri, T., Mazzini, G., Zuccotti, M., Redi, C. A., & Garagna, S. (2008). Karyotype analysis of the euploid cell population of a mouse embryonic stem cell line revealed a high incidence of chromosome abnormalities that varied during culture. *Cytogenetic and Genome Research*, 121(1), 18–24. <https://doi.org/10.1159/000124377>
113. 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 Reviews and Reports*, 8(4), 1211–1222. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9397-0>

114. Roselli, E.A., Lazzati, S., Iseppon, F., Mangianini, M., Marcato, L., Gariboldi, M. B., Maggi, F., Grati, F.R., Simoni, G. (2013). Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: Cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy*, 15, 1340-1351.
115. Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martín, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C., & Bernad, A. (2005). Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Research*, 65(8), 3035–3039. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4194>
116. Rutigliano, L., Corradetti, B., Valentini, L., Bizzaro, D., Meucci, A., Cremonesi, F., & Lange-Consiglio, A. (2013). Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 133. <https://doi.org/10.1186/scrt344>
117. Sasaki, R., Aoki, S., Yamato, M., Uchiyama, H., Wada, K., Ogiuchi, H., Ando, T. (2011). PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(10), 823–830. <https://doi.org/10.1002/term.387>
118. Sato, K., Yamawaki-Ogata, A., Kanemoto, I., Usui, A., & Narita, Y. (2016). Isolation and characterisation of peripheral blood-derived feline mesenchymal stem cells. *The Veterinary Journal*, 216, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.08.009>
119. Screven, R., Kenyon, E., Myers, M. J., Yancy, H. F., Skasko, M., Boxer, L., Zhu, M. (2014). Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161(1–2), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.06.002>
120. Sensebé, L., Tartle, K., Galipeau, J., Krampera, M., Martin, I., Phinney, D.G., Shi, Y. (2012). Limited acquisition of chromosomal aberration in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*, 10, 9-11.
121. Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Mark Bartold, P., Batouli, S., Brahim, J., Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364(9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
122. Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(4), 696–704. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>
123. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One*, 1(1), e79. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
124. Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine*, 54, 132–141. <https://doi.org/10.2302/kjm.54.132>
125. Stultz, B. G., McGinnis, K., Thompson, E. E., Lo Surdo, J. L., Bauer, S. R., & Hursh, D. A. (2016). Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. *Cytotherapy*, 18(3), 336–343. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2015.11.017>

126. Sun, H.-H., Chen, B., Zhu, Q.-L., Kong, H., Li, Q.-H., Gao, L.-N., Yu, Q. (2014). Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials*, 35(35), 9459–9472. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.003>
127. Syed-Picard, F. N., Du, Y., Lathrop, K. L., Mann, M. M., Funderburgh, M. L., & Funderburgh, J. L. (2015). Dental pulp stem cells: a new cellular resource for corneal stromal regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(3), 276–285. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0115>
128. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
129. 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 Veterinary Research*, 8(1), 150. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-150>
130. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6), 825–37. doi: 10.1038/nprot.2009.53.
131. Torre, M.L., Lucarelli, E., Guidi, S., Ferrari, M., Alessandri, G., De Girolamo, L., Pessina, A., Ferrero, I. and on behalf of the Gruppo Italiano Staminali Mesenchimali (GISM). (2015). Ex Vivo Expanded Mesenchymal Stromal Cell Minimal Quality Requirements for Clinical Application. *Stem Cells and Development*, 24(6), 677–685.
132. Trzil, J. E., Masseau, I., Webb, T. L., Chang, C.-H., Dodam, J. R., Cohn, L. A., 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 and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(12), 1546–1557. <https://doi.org/10.1111/cea.12411>
133. Trzil, Julie E, Masseau, I., Webb, T. L., Chang, C.-H., Dodam, J. R., Liu, H., Quimby, J.M, Dow, S.W., Reiner, C. R. (2016). Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1098612X15604351-. <https://doi.org/10.1177/1098612X15604351>
134. Vidal, M. A., Kilroy, G. E., Johnson, J. R., Lopez, M. J., Moore, R. M., & Gimble, J. M. (2006). Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery*, 35(7), 601–610. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2006.00197.x>
135. Vidal, M. A., Walker, N. J., Napoli, E., & Borjesson, D. L. (2012). Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue. *Stem Cells and Development*, 21(2), 273–283. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0589>
136. Vidane, A. S., Souza, A. F., Sampaio, R. V, Bressan, F. F., Pieri, N. C., Martins, D. S., Mierelles, F.V., Migliano, M.A., Ambrósio, C. E. (2014). Cat amniotic membrane

- multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 7, 71–78. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S67790>
137. Villatoro, A. J., Claros, S., Fernández, V., Alcoholado, C., Fariñas, F., Moreno, A., Becerra, J.A., Andrades, J. A. (2018). Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1413-4>
 138. Wagner, W. (2017) Epigenetic aging clocks in mice and men. *Genome Biology*. 17, 107.
 139. Wang, Youwei, Han, Z.-B., Song, Y.-P., & Han, Z. C. (2012). Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells International*, 2012, 652034. <https://doi.org/10.1155/2012/652034>
 140. 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(4), e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
 141. Webb, T. L., & Webb, C. B. (2014). Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. <https://doi.org/10.1177/1098612X14561105>
 142. Weiss, M. L., & Troyer, D. L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews*, 2(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>
 143. Werle, S. B., Lindemann, D., Steffens, D., Demarco, F. F., de Araujo, F. B., Pranke, P., & Casagrande, L. (2016). Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clinical Oral Investigations*, 20(1), 75–81. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1477-5>
 144. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G., & Tredget, E. E. (2007). Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells*, 25(10), 2648–2659. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0226>
 145. Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Sugito, T., Yoshimi, R., Nagasaka, T., & Ueda, M. (2010). A Feasibility of Useful Cell-Based Therapy by Bone Regeneration with Deciduous Tooth Stem Cells, Dental Pulp Stem Cells, or Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Study Using Tissue Engineering Technology. *Tissue Engineering Part A*, 16(6), 1891–1900. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0732>
 146. Yaneselli, K., Campbell, V., Algorta, A., Bonfiglio, C., Mirazo, J., Fernandez, S., Rios, M., Llambí, S., Maisonnave, J. (2018). Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 54(209), 18–25. <https://doi.org/10.29155/VET.54.209.3>
 147. Yazid, F. B., Gnanasegaran, N., Kunasekaran, W., Govindasamy, V., & Musa, S. (2014). Comparison of immunodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. *Clinical Oral Investigations*, 18(9), 2103–2112. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1207-4>
 148. Yildirim, S. (2013). SpringerBrief in Stem Cells. Dental Pulp Stem Cells. *SpringerBriefs*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5687-2>

149. Zajic, L. B., Webb, T. L., Webb, P., Coy, J. W., Dow, S. W., & Quimby, J. M. (2017). Comparison of proliferative and immunomodulatory potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from young and geriatric cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. <https://doi.org/10.1177/1098612X16680703>
150. Zhang, W., Walboomers, X. F., Wolke, J. G. C., Bian, Z., Fan, M. W., & Jansen, J. A. (2005). Differentiation Ability of Rat Postnatal Dental Pulp Cells in Vitro. *Tissue Engineering*, 11(3–4), 357–368. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.357>
151. Zhang, Weibo, Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., & Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Engineering*, 12(10), 2813–2823. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2813>
152. 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. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295.
153. 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 Engineering*, 7(2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>

10. ANEXOS

ANEXO I. Datos de donantes

I.a. Donantes de tejido adiposo

	Individuo	Edad	gr de grasa	Serologia	Aislamiento	Incluido
1	G10	4A	<0,5	NEG	SI	SI
2	CAR	10M	1,5	NEG	SI	SI
3	SHA	6M	0,5	NEG	SI	SI
4	AV2	7M	<0,5	NEG	SI	SI
5	AV1	5M	<0,5	NEG	SI	NO
6	GRA A	9M	2	NEG	SI	SI
7	GRA B	8M	1,5	NEG	SI	SI
8	GRA C	1A	1	NEG	SI	SI
9	G1	6M	<0,5	SD	SI	SI
10	G2	6M	1	SD	SI	Puesta a punto
11	M3	4A	0,5	NEG	SI	Puesta a punto
12	-	2A	0,5	VIF POS	SI	Excluido
13	G5	5A	1	NEG	SI	SI
14	G6	5A	<0,5	NEG	SI	SI
15	R9	1A	1	NEG	SI	SI
16	R9	1A	1	NEG	SI	SI
17	R11	2A	1	NEG	SI	NO
18	M4	8M	1	SD	SI	NO
19	MOR	8M	<1	NEG	SI	SI
20	-	1A	<0,5	NEG	NO	NO
21	-	1A	<0,5	NEG	NO	NO
22	-	6M	<0,5	NEG	NO	NO

I.b. Donantes de pulpa dental

Individuo	Edad	Causa de muerte	Aislamiento
C1	10M	Neumotórax	SI
FEL 3	<1,5A	Politraumatizado, muerte durante cirugía	Contaminado
M2	8M	Politraumatizado	SI
FEL 4	10A	Disnea y hematuria	NO

ANEXO II. Relación núcleo citoplasma para CMM TA y CMPD felina. La table contiene datos de media y desvío estándar.

<i>CMM TA:</i>	P₂	P₄	P₆
G10	0,059+/-0.019	0.039+/-0.049	0,074+/-0.033
R9	-	0.053+/-0.016	0,025+/-0.0086
GRA A	-	0.034+/-0.010	-
GRA C	0,054+/-0,019	0.064+/-0.026	-
GRAB	-	0,039 +/-0.016	-
<i>CMPD:</i>			
C1	0,0071+/-0,0032	0,016+/-0,008	0,025+/-0,015

ANEXO III. Datos de ensayos de proliferación celular.

III. Tiempo de doblaje en CMM TA. El cuadro contiene datos de media y desvío estándar.

DT en días de CMM TA			
Id	P ₂	P ₄	P ₆
G10	1,78 ± 0,012	4,21 ± 0,660	2,22 ± 0,173
AV2	1,99 ± 0,064	16,165 ± 6,97	NC
G11	3,613 ± 0,323	6,61 ± 0,686	NC
CAR	5,09 ± 0,679	NC	NC
SHA	2,05 ± 0,265	NC	NC
GRAA	2,22 ± 0,116	17,64	NC
GRAB	1,88 ± 0,097	9,23 ± 2,99	NC
G9	3,52 ± 0,403	2,60 ± 0,552	18,98 ± 1,80
GRAC	2,90 ± 0,302	16 ± 16,7	NC

NC: no creció

ANEXO IV. Tridiferenciación

IV.a Días de cultivo hasta la tridiferenciación de CMM TA

Id	Linaje		
	Adiposo	Cartilaginoso	Óseo
AV2	5 y 8 días	7 a 10 días	8 a 11 días
CAR	16 y 22 días	9 días	18 días
G10	8 días	8 días	No creció
SHA	No creció	4 días	No creció

IV.b Días de cultivo hasta la tridiferenciación de CMPD

Id	Linaje		
	Adiposo	Cartilaginoso	Óseo
C1	No creció	12 y 15 días	15 días
M2	10 días	14 y 24 días	14 a 24 días

ANEXO V. Datos de ensayos de citogenética

V.a. Cantidad de metafases analizadas por pasaje y por individuo de cultivos de CMM TA

Pasaje	Individuo	Cantidad de metafases		
		Totales	Alteradas	% Aberrantes
P ₂	G1	19	5	26,32
	G6	99	33	33,33
	G10	100	26	26
	G11	18	6	33,33
	GRAB	10	2	20
	GRAC	21	4	19,05
	AV2	No se observaron metafases		
	R8	No se observaron metafases		
P ₄	G10	12	2	16,67
	R9	12	4	33,33
	G5	18	6	33,33
	G6	19	3	15,79
	AV2	No se observaron metafases		
	G11	No se observaron metafases		
P ₆	G5	97	24	24,74
	G11	Escaza cantidad de celulas		
	G10	Escaza cantidad de celulas		
	R9	4	1	-

(-) metafases insuficientes

V.b. Cantidad de metafases analizadas en cultivos sucesivos de CMM TA y de un mismo individuo.

	G10		G6		G5	
	P ₂	P ₄	P ₂	P ₄	P ₄	P ₆
n metafases totales	100	12	99	19	18	97
n metafases alteradas	26	2	33	3	6	24
% aberraciones	26	16,66	33,33	15,79	33,33	24,74
<i>p</i> =	0,727		0,176		0,5591	

V.c. Cantidad de alteraciones por individuo y por pasaje de cultivos de CMM TA

Alteraciones	Metafases con alteraciones específicas por individuo: %/(n alteraciones/ n metafases analizadas)									
	P ₂						P ₄			
	G1	G10	G11	G6	Gra B	Gra C	G5	G10	G6	R9
Aneuploidía	0 (0/19)	2* (2/100)	0 (0/18)	0 (0/98)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/18)	0 (0/12)	5,26 (1/19)	0 (0/12)
Poliploidía	5,26* (1/19)	6 (6/100)	0 (0/18)	10,20 (10/98)	10 (1/10)	0 (0/10)	0 (0/18)	0 (0/12)	5,26 (1/19)	25 (3/12)
Fractura	15,78 (3/19)	1 (1/100)	5,55 (1/18)	4,08 (4/98)	0 (0/10)	4,76 (1/10)	11,11 (2/18)	0 (0/12)	0 (0/19)	0 (0/12)
Gap	0 (0/19)	2 (2/100)	22,22 (4/18)	7,14 (7/98)	10 (1/10)	4,76 (1/10)	5,55 (1/18)	8,33 (1/12)	0 (0/19)	8,33 (1/12)
Duplicación	21,05 (4/19)	5 (5/100)	0 (0/18)	4,08 (4/98)	0 (0/10)	0 (0/10)	5,55 (1/18)	0 (0/12)	5,26 (1/19)	0 (0/12)
Delección	15,78 (3/19)	8 (8/100)	5,55 (1/18)	3,06 (3/98)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/18)	0 (0/12)	0 (0/19)	0 (0/12)
Separacion de cromatida	10,52 (2/19)	6 (6/100)	0 (0/18)	5,10 (5/98)	10 (1/10)	4,76 (1/10)	22,22 (4/18)	0 (0/12)	0 (0/19)	0 (0/12)
observaciones	*diplocrom	37,XX-E							39,XX+E	

Diplocrom = diplocromosoma

V.d. Cantidad de alteraciones por individuo y por pasaje de cultivos de CMPD

Alteraciones	Metafases con alteraciones específicas por individuo: n alteraciones/ n metafases			
	P ₂		P ₄	
	C1	M2	C1	M2
Aneuploidia	0/5	1/9*	0/47	
Poliploidia	1/5	1/9	2/47*	1/4
Fractura	1/5	1/9	4/47	
Gap	0/5	1/9	2/47	
Duplicación	0/5	2/9	1/47	
Delección	0/5	0/9	1/47	
Separacion de cromatida	0/5	2/9	3/47	
observaciones	39,XX+1C		*diplocrom	

Diplocrom=diplocromosoma

V.e. Cantidad y tipo de alteración por individuo y grupo cromosómico afectado

Alteración	Grupo cromosómico					
	A	B	C	D	E	F
Fractura	2	2	1	1	1	-
Gap	2	4	2	1	-	1
Delección	3	2	1	1	1	-
Duplicación	4	5	1	1	-	-
TOTAL	11	13	5	4	2	1



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^{1,2}, 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, Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay.

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

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

⁴Departamento Genética y Mejoramiento Animal, Facultad de Veterinaria, Lasplaces 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