

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

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

Kevin Yaneselli¹, Valeria Campbell^{1,3}, Agustina Algorta^{1,2}, Clara Bonfiglio¹; Javier Mirazo³; Sofia 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

Introducción

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

Materiales y métodos

Extracción de TA

a) Caninos y Felinos

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

b) Equinos

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

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

Aislamiento de CMM-TA

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

Cultivo y criopreservación de las CMM

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

Caracterización de las CMM

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

Para comprobar el poder clonogénico de las CMM-TA entre los P₂-P₄, las mismas fueron sembradas a una concentración de 1 x10³ células/hoyo, por triplicado, en placas de cultivo celular de 6 hoyos, adaptado del protocolo de Guercio (Guercio y col., 2013). Se utilizó el MC correspondiente para cada especie y cada 3 o 4 días se realizaba el cambio de medio. Transcurridas las 2 semanas los cultivos fueron fijados con metanol frío (-20 °C) y teñidos con Giemsa.

b) Tridiferenciación *in vitro*

Las CMM-TA entre P₂-P₄ fueron sembradas a una concentración de 9,4 x10³ células/hoyo en placas de cultivo celular de 24

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

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

Resultados

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

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

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

Caracterización de las CMM-TA

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

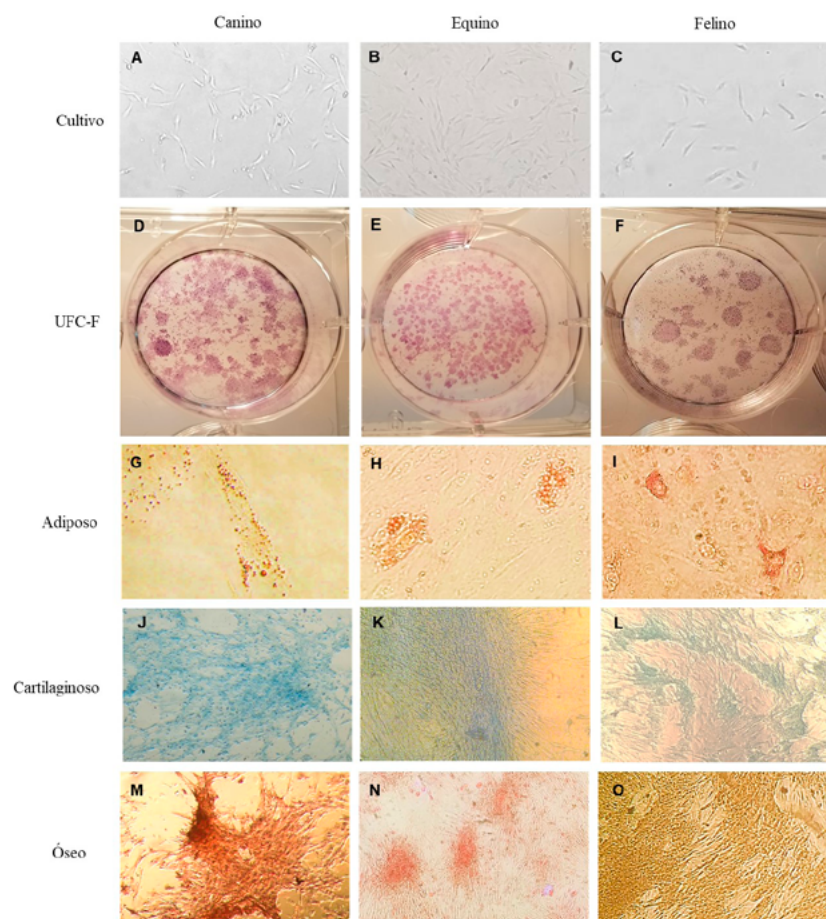


Figura 1. Imagen microscópica del cultivo celular de las CMM-TA 40x de las especies: **A** canina, **B** equina y **C** felina. Imagen macroscópica de UFC-F: **D**, **E** y **F** de las tres especies, respectivamente. Imagen microscópica de la prueba de tridiferenciación *in vitro* de las CMM-TA provenientes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

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

Discusión

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

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

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

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

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

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

Conclusiones

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

Referencias

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

- 85:1927-1935.
4. Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJ, Kol A, Walker NJ, Badgley MR, Fazel N, Murphy WJ, Vapniarsky N, Borjesson DL. (2016). Therapeutic efficacy of fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. *Stem Cells Transl Med* 5:75-86.
 5. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the international society cellular therapy (ISCT). *Cytherapy* 15:641-648.
 6. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects the effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80:985-996.
 7. Clark KC, Fierro FA, Ko EM, Walker NJ, Arzi B, Tepper CG, Dahlenburg H, Cicchetto A, Kol A, Marsh L, Murphy WJ, Fazel N, Borjesson DL. (2017). Human and feline adipose-derived mesenchymal stem cells have comparable phenotype, immunomodulatory functions, and transcriptome. *Stem Cell Res Ther* 8:1-16.
 8. de Mattos Carvalho A, Alves AL, de Oliveira PG, Álvarez LE, Amorim RL, Hussni CA, Deffune E. (2011). Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J Equine Vet Sci* 31:26-34.
 9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytherapy* 8:315-317.
 10. Fernández S, Ríos M. (2016). Comparación de suero fetal bovino y lisado plaquetario alogénico en el cultivo de células madre mesenquimales equinas. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
 11. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393-403.
 12. Gómez MC, Qin Q, Biancardi MN, Galiguis J, Dumas C, MacLean RA, Wang G, Pope CE. (2015). Characterization and multilineage differentiation of domestic and black-footed cat mesenchymal stromal/stem cells from abdominal and subcutaneous adipose tissue. *Cell Reprogram* 17:376-392
 13. Guercio A, Di Bella S, Casella S, Di Marco P, Russo C, Piccione G. (2013). Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int* 37:789-798.
 14. Hillmann A, Ahrberg AB, Brehm W, Heller S, Josten C, Paebst F, Burk J. (2016). Comparative characterization of human and equine mesenchymal stromal cells: a basis for translational studies in the equine model. *Cell Transplant* 25:109-124.
 15. Hoffman AM, Dow SW. (2016). Concise review: stem cell trials using companion animal disease models. *Stem Cells* 34: 1709-1729.
 16. James AW, Zhang X, Crisan M, Hardy WR, Liang P, Meyers CA, Lobo S, Lagishetty V, Childers MK, Asatrian G, Ding C, Yen YH, Zou E, Ting K, Peault B, Soo C. (2017). Isolation and characterization of canine perivascular stem/stromal cells for bone tissue engineering. *PLoS One* 12(5):e0177308.
 17. Kang BJ, Ryu HH, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Woo HM, Kim WH, Kweon OK. (2012). Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci* 13:299-310.
 18. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemyer GP, Baker HJ. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30:879-886.
 19. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng* 13:2949-2955.
 20. Quimby JM, Webb TL, Habenicht LM, Dow SW. (2013). Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther* 4:1-12.
 21. Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME. (2012). Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev* 8:1211-1222.
 22. Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC, Borjesson DL, Zhu M. (2014). Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol* 116:21-31.
 23. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132-141.
 24. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* 36:613-622.
 25. Yaneselli K, Filomeno A, Semiglia G, Arce C, Erickson K. (2013). Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. *Veterinary*

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