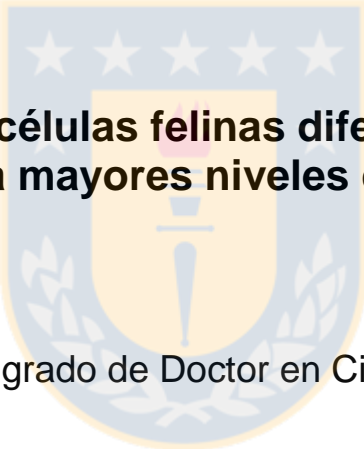




Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Veterinarias-Programa de Doctorado en Ciencias  
Veterinarias



**Plasticidad de células felinas diferenciadas y su  
transición a mayores niveles de potencia**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

DIANA MARITZA ECHEVERRY BERRÍO  
CHILLÁN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Fidel Ovidio Castro  
Dpto. de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

PLASTICIDAD DE CÉLULAS FELINAS DIFERENCIADAS Y SU TRANSICIÓN A  
MAYORES NIVELES DE POTENCIA

**Aprobada por:**

Fidel Ovidio Castro Reboredo

Ing. Zootecnista, PhD.

---

Profesor guía

Lleretny Rodríguez Álvarez

Lic. Microbiología, PhD

---

Evaluadora interna

Carlos Escudero

Médico, PhD

---

Evaluador interno

Francisco Nualart Santander

Biólogo, PhD

---

Evaluador externo

Manuel Quezada Orellana

Med. Veterinario, PhD

---

Director(s) de Programa



## **FINANCIAMIENTO**

El desarrollo de este estudio fue financiado por la Beca CONICYT Doctorado Nacional para extranjeros N° 63140147 (2014-2018) y recursos propios del Laboratorio de Biotecnología Animal del departamento de Ciencia Animal, Universidad de Concepción.



## AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta etapa ha sido posible gracias al apoyo de personas e instituciones a las cuales deseo expresarles mi gratitud y reconocimiento, ya que estuvieron en puntos críticos de todo este camino. El orden de agradecimientos no implica una jerarquía o importancia, pero en empezaré por agradecer a Chile, por su compromiso con el desarrollo de sus países vecinos, reconociendo la importancia de trascender más allá de sus fronteras con el apoyo en la formación académica de personas que pueden generar impacto en la región, adherido a la globalización, a los cambios positivos y al progreso.

La Universidad de Concepción se convirtió en mi segundo hogar y en escenario de mi crecimiento profesional y personal y por eso estaré siempre agradecida y la llevaré en mi memoria. Agradezco a las personas de esta institución por su buen trato y diligencia en la medida que solicité ayuda de ellos, no se imaginan lo mucho que su trabajo hecho con amor facilita la vida de un estudiante.

A mi Alma mater, mi Universidad de Antioquia, porque siempre en tu claustro alimenté mis sueños de volar lejos, me diste alas para superar las adversidades, fue lo primero que aprendimos en tus aulas. Agradezco la educación pública, el mejor regalo, la mejor oportunidad para el desarrollo de un ser humano, la que me brindó mi patria amada, porque sin mi profesión no estaría en este lugar y por ello me considero afortunada.

A Colombia le debo mucho más de lo que pueda decir, de lo que pueda escribir o pensar. Estando lejos me di cuenta de cuán fuertes son mis raíces, pero como un árbol, mis ramas crecieron y se expandieron. No importa dónde esté hoy o mañana, siempre estaré orgullosa de mis orígenes. Espero haber sido una buena embajadora de mi país aquí en Chile, es la mejor forma de agradecerle.

Mis agradecimientos pueden ser un poco extensos, pero este texto que simboliza la consecución de un logro, se viene gestando desde mucho antes de yo nacer. Aquí están plasmados los esfuerzos de dos generaciones de campesinos humildes, trabajadores, superando de a poco las épocas de violencia y pobreza. Estos logros se gestan gracias a los abuelos que trabajaron de sol a sol en los campos, a los padres que caminaban horas, atravesando ríos y montañas para llegar a la escuelita rural, a esa madre que aún con hijos y un pésimo salario no se rindió y se las ingenió para ser profesional y tener un posgrado. A un padre que lleva años trabajando más de 12 horas diarias los 7 días de la semana y que me ha dejado como enseñanza que cualquiera que sea el trabajo hay

que hacerlo con empeño y pasión. A ellos dos que han sido un gran ejemplo, que aún hoy día me apoyan en cada decisión, en los momentos favorables y los adversos; ellos, mi principal motivación para avanzar, les quiero agradecer y dedicarles este título, es más suyo que mío.

A mi querido esposo, quien ha sido el más grande apoyo emocional, mi pilar cuando todo me falta, mi pedacito de Colombia, quien nunca me dejó rendir y quien siempre me ha dado la libertad de soñar. Eres un ejemplo de ser humano, noble, solidario y empático. Gracias por tu comprensión, tu alegría y tu humildad, cualidades que aprecio demasiado.

A mis hermanos, gracias por soportar las lejanías, aunque la familia está dividida físicamente, estamos unidos de corazón y siempre tuvieron el consejo certero para solucionar los problemas pasajeros; cada pequeño logro no hubiese tenido significado sino tuviera hermanos con quien compartir y celebrar. A mis suegros, a mis amigos en Colombia y en Chile, a Alejandro, Anita, Elizabeth y Ervin, quienes se convirtieron en mi familia. Agradezco a mi pequeña comunidad de amigos chilenos y extranjeros, fueron un apoyo fundamental en este proceso. Quiero agradecer también a Paula, Carolina, Daniela y Pilar que siempre han estado desde un principio y nos dieron la mano en momentos muy difíciles.

Quiero agradecer a las personas con las que he trabajado, con las que comparto el día a día, a los que tuvieron algo que enseñarme. Agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Animal, pero especialmente a Constanza Aguilera, por trabajar conmigo aun siendo más de las 10 de la noche, fines de semana, con climas adversos y muchas veces, con hambre; siento que logramos muchas cosas juntas y eres parte importante de estos resultados. Así mismo, extendiendo mis agradecimientos a Daniela Rojas, al tiempo que dedicó a trabajar conmigo para llevar a cabo muchos de los experimentos de este estudio.

Por último, no menos importante, quiero agradecer a mi profesor guía, Fidel Ovidio Castro, por darme un rumbo cuando me sentía perdida o frustrada frente a los resultados, por su enorme paciencia, calidez humana y gestión, por ayudarme a ser más autónoma e independiente. Los buenos resultados vienen acompañados de mucho esfuerzo y rara vez la suerte juega un papel importante en esto, pero tengo que admitir que tuve mucha suerte de encontrar un excelente tutor y desarrollar un trabajo que me apasionó durante estos 5 años. Así mismo, quiero agradecer a la doctora Lleretny Rodríguez por guiarme y ayudar a fortalecer la parte molecular de mi trabajo

de investigación cuando lo requerí, además de ser gran ejemplo como mujer en el campo científico.

A todos ustedes, mil gracias!



## **Resumen**

La obtención de células madre mesenquimales (MSC) en algunas ocasiones puede ser un procedimiento invasivo en los felinos, particularmente cuando existen patologías, traumas o situaciones específicas en las cuales está contraindicado el procedimiento quirúrgico para obtener biopsias de tejido. La inducción de células somáticas diferenciadas hacia células madre mesenquimales es una herramienta recientemente descrita en humanos y ratones, la cual promete ser exitosa y evadir las complicaciones descritas. Esta metodología se basa principalmente en modificar la expresión génica de las células diferenciadas con el uso de remodeladores epigenéticos, factores de crecimiento y pequeñas moléculas que facilitan la reconversión o de-diferenciación para la obtención de un mayor nivel de potencia.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la plasticidad de dos tipos celulares de origen felino, fibroblastos y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSC), frente a varios protocolos de inducción a multipotencia. Para lograr este objetivo se emplearon dos remodeladores epigenéticos, el ácido valproico y la 5-azacitidina, junto con plasma rico en plaquetas como fuente de factores de crecimiento, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento derivado de plaquetas para conferir características multipotentes a las células reprogramadas. En este estudio también se produjo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (h-PDGF-B) por transfección estable de células mamíferas.

Los fibroblastos y AMSC fueron obtenidos de gatas domésticas entre 6 meses y 3 años. Los protocolos fueron estandarizados y se evaluó su efectividad en inducir características multipotentes reflejadas en expresión de genes de pluripotencia, marcadores de superficie y capacidad de diferenciación mesodérmica.

La expresión de OCT4 incrementó significativamente en fibroblastos felinos ( $p < 0,05$ ), así mismo se logró la diferenciación hacia linajes mesodérmicos (adipogénesis, condrogénesis y osteogénesis) con el uso del protocolo de reprogramación con 5AZA y VPA durante 12 días. Otros tratamientos arrojaron resultados parciales, confiriendo aumento en la expresión de OCT4 y/o capacidad limitada de diferenciación hacia uno o dos linajes mesodérmicos.

Las AMSCs por su parte no presentaron cambios significativos en la expresión de genes o potencial de diferenciación con el uso de los remodeladores epigenéticos, con excepción de potenciar la diferenciación osteogénica con el pretratamiento con estas moléculas.

Los resultados obtenidos demuestran que las células somáticas felinas presentan determinada plasticidad que puede ser aprovechada para diferentes eventos de reprogramación celular, en este caso, para obtener un estado multipotente o favorecer la diferenciación hacia determinado linaje mesodérmico.

Sin embargo, este protocolo requiere algunos ajustes en orden de lograr una mayor eficiencia de reprogramación de fibroblastos hacia iMSCs. Estos resultados son de importancia para en el área de la medicina regenerativa y otras aplicaciones biotecnológicas en especies de la familia Felidae.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales inducidas, felinos, reprogramación, remodeladores epigenéticos.





## **Abstract**

Obtaining mesenchymal stem cells (MSC) can sometimes be an invasive procedure for some species, especially in felines, and particularly when there are pathologies or physical traumas in which it is contraindicated some surgical procedure to obtain tissue biopsies. The induction of differentiated somatic cells into mesenchymal stem cells is a recently described tool in humans and mice, which promises to be successful and evade the described complications. This methodology is mainly based on modifying the gene expression of cells with the use of epigenetic remodelers, growth factors and small molecules that facilitate the conversion or de-differentiation to obtain a higher level of potency.

The objective of this study was to evaluate the plasticity of two cell types of feline origin, fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (AMSC), compared to several induction protocols to multipotency. To achieve this objective, two epigenetic modifiers, valproic acid and 5-azacitidine were used together with platelet-rich plasma as a source of growth factors, epidermal growth factor and platelet-derived growth factor, and some molecules to confer multipotent characteristics to reprogrammed cells. In this study was also produced the platelet derived growth factor (h-PDGF-B) by stable transfection of mammalian cells.

Fibroblasts and AMSC were obtained from domestic cats between 6 months and 3 years. The protocols were standardized and their effectiveness was also evaluated and reflected in the expression of pluripotency genes, surface markers and ability of mesodermal differentiation.

The expression of pluripotency gen OCT4 managed to induce significantly in feline fibroblasts ( $p < 0.05$ ), and the differentiation towards mesodermal lineages was also achieved (adipogenesis, chondrogenesis and osteogenesis) with the use of the protocol with 5AZA and VPA for 12 days. Other treatments yielded partial results, conferring increase in the expression of OCT4 and limited capacity of differentiation towards one or two mesodermal lineages.

The AMSCs however, did not improve their multipotent characteristics with the use of epigenetic remodelers, with the exception of enhancing the osteogenic differentiation with the pretreatment of these molecules.

The results show that feline somatic cells present a certain plasticity that can be used for different events of cellular reprogramming, in this case, to obtain a multipotent state. However, this protocol requires some adjustments in order to achieve a higher rate of fibroblast reprogramming efficiency towards iMSCs. These results are of importance for in the area of regenerative medicine and other biotechnological applications in the species of the Felidae family.

**Key words:** Induced mesenchymal stem cells, feline, reprogramming, epigenetic modifiers.

# TABLA DE CONTENIDO

	Pág
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
<b>1. Terapia Celular</b>	<b>5</b>
1.1 <i>Los felinos como modelo de enfermedad y objeto de estudio</i>	5
<b>2. El concepto de célula madre</b>	<b>8</b>
<b>3. Células Madre Embrionarias (ESC)</b>	<b>9</b>
<b>4. Células Madre Mesenquimales (MSC)</b>	<b>10</b>
4.1 <i>Tejidos fuente de células madre mesenquimales (MSC)</i>	12
4.1.1 <i>Médula ósea</i>	12
4.1.2 <i>Sangre periférica</i>	13
4.1.3 <i>Cordón umbilical</i>	13
4.1.4 <i>Membranas fetales</i>	14
4.1.5 <i>Tejido adiposo</i>	15
4.1.6 <i>Membrana sinovial</i>	16
4.1.7 <i>Ligamento periodontal</i>	17
4.1.8 <i>Piel</i>	17
4.1.9 <i>Tejidos endometriales</i>	18
4.1.10 <i>Otras fuentes potenciales de MSCs</i>	18
<b>5. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)</b>	<b>19</b>
5.1 <i>Células madre pluripotentes inducidas de felinos (iPSC)</i>	20
<b>6. Células madre mesenquimales inducidas (iMSC)</b>	<b>20</b>
<b>7. Reprogramación celular a partir de moléculas reprogramadoras</b>	<b>22</b>
<b>8. Fases de la reprogramación de células somáticas</b>	<b>25</b>
8.1 <i>Fase temprana o de iniciación</i>	25
8.2 <i>Fase intermedia o de maduración</i>	25
8.3 <i>Fase de estabilización</i>	25
<b>9. Mecanismos que pueden determinar la eficiencia de la reprogramación de células somáticas</b>	<b>27</b>
<b>10. Reprogramación hacia otros tipos celulares y niveles de potencia</b>	<b>29</b>
10.1 <i>Transdiferenciación</i>	29
10.2 <i>Dediferenciación</i>	33
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>35</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>

1.	<b>Lugar de trabajo</b>	<b>36</b>
2.	<b>Obtención de las muestras</b>	<b>36</b>
3.	<b>Cultivos celulares</b>	<b>36</b>
3.1	<i>Fibroblastos dérmicos de gata</i>	36
3.2	<i>Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSC) de gata</i>	36
3.3	<i>Cultivo de células SIHA y HK-293</i>	37
4.	<b>Ensayo tiempo de doblaje celular</b>	<b>37</b>
5.	<b>Citometría de flujo</b>	<b>37</b>
6.	<b>Preparación del plasma rico en plaquetas – PRP</b>	<b>38</b>
7.	<b>Transfección estable de células SIHA y HK-293 con h-PDGF-B</b>	<b>38</b>
8.	<b>Dot Blot para identificación de proteínas con cola de histidina</b>	<b>39</b>
9.	<b>Ensayo de proliferación celular de fibroblastos de gato doméstico con h-PDGF-B</b>	<b>40</b>
10.	<b>Protocolos de inducción a multipotencia de fibroblastos (iMSC) y tratamientos de AMSC en medio condicionado</b>	<b>42</b>
11.	<b>Ensayos de diferenciación para fibroblastos y AMSC reprogramados</b>	<b>43</b>
12.	<b>Ensayo de formación de colonias fibroblastoides (CFU-F)</b>	<b>44</b>
13.	<b>qRT-PCR</b>	<b>45</b>
14.	<b>Inmunocitoquímica</b>	<b>47</b>
15.	<b>Ensayos de migración</b>	<b>47</b>
16.	<b>Análisis estadístico</b>	<b>48</b>
	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
	<b>Determinación del patrón de marcadores de superficie y genes de pluripotencia en fibroblastos y AMSC felinas</b>	<b>49</b>
	<i>Patrón de marcadores de superficie de fibroblastos</i>	50
	<i>Expresión de genes de pluripotencia OCT4 y NANOG en fibroblastos</i>	51
	<i>Ensayos de migración en AMSC de gato</i>	51
	<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica en AMSC de gato</i>	52
	<b>Reprogramación de fibroblastos empleando ácido valproico (VPA) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP) como factor de crecimiento</b>	<b>54</b>
	<i>Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con VPA+PRP</i>	54
	<i>Inmunocitoquímica para Oct4, Cd44 y Cd90 en fibroblastos felinos reprogramados con VPA+PRP</i>	56
	<i>Citometría de flujo para evaluar expresión de marcadores de superficie en fibroblastos felinos reprogramados con VPA+PRP</i>	57
	<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica en fibroblastos de gato doméstico bajo tratamiento con VPA+PRP</i>	58
	<i>Inmunocitoquímica para expresión de vimentina en fibroblastos tratados con VPA+PRP</i>	58
	<i>Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos de gato doméstico reprogramados con VPA+EGF</i>	60

<i>Inmunocitoquímica para expresión de Oct4 en fibroblastos tratados con VPA+EGF</i>	61
<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con VPA+EGF</i>	62
<i>Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con VPA+h-PDGF-B</i>	63
<i>Inmunocitoquímica para expresión de Oct4 en fibroblastos tratados con VPA + h-PDGF-B</i>	65
<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con VPA + h-PDGF-B</i>	65
<b>Reprogramación de fibroblastos empleando 5-Azacidina (5-AZA), Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y h-PDGF-B</b>	<b>67</b>
<i>Expresión de genes de OCT4, NANOG, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos reprogramados con 5-AZA + PRP</i>	67
<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con 5-AZA + PRP</i>	68
<i>Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con 5-AZA + h-PDGF-B</i>	69
<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con 5-AZA + h-PDGF-B</i>	70
<i>Ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC) para líneas de fibroblastos reprogramadas con 5-AZA + h-PDGF-B</i>	73
<b>Reprogramación de AMSC con remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento</b>	<b>76</b>
<i>Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie en AMSC tratadas con VPA+A8301</i>	76
<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSCs reprogramadas con VPA+A8301</i>	77
<i>Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie en AMSC tratadas con 5-AZA + h-PDGF-B</i>	78
<i>Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSCs reprogramadas con 5-AZA + h-PDGF-B</i>	80
<i>Análisis de correlación entre la expresión de E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos y AMSC reprogramados</i>	81
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Pág.</b>
<b>1.</b>	Tipo de tratamiento, patología, dosis y vías de administración de MSC en felinos. Fuente: Quimby et al., 2013; Quimby et al., 2015; Arzi et al., 2016; Park et al., 2013 y Kol et al., 2015.	8
<b>2.</b>	Expresión de marcadores de células madre mesenquimales derivadas de diferentes tejidos en felinos. Fuente: Webb et al., 2011; Iacono et al., 2012; Kono et al., 2014; Arzi et al., 2015 y Gómez et al., 2015.	11
<b>3.</b>	Expresión de marcadores de superficie de MSC derivadas de tejido adiposo en algunas especies. (Pos: Positivos, Neg: Negativos, ND: No hay datos). Fuente: Taketmitsu et al., 2012; Iacono et al., 2012; Kono et al., 2014; Arzi et al., 2015; Gómez et al., 2015 y Mumaw et al., 2015.	16
<b>4.</b>	Pequeñas moléculas empleadas en reprogramación de células somáticas. Fuente: Modificado de Lin y Wu 2015.	24
<b>5.</b>	Potenciales terapéuticos como blanco para la regeneración a partir de transdiferenciación. Fuente: Merrell y Stanger, 2016.	32
<b>6.</b>	Combinación de moléculas para inducción de células somáticas felinas empleando PRP. Fuente: Elaboración propia.	43
<b>7.</b>	Combinación de moléculas para inducción de células somáticas felinas empleando h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.	43
<b>8.</b>	Secuencias de cebadores específicos de gato doméstico para detectar expresión de genes endógenos felinos. Fuente: Elaboración propia.	46
<b>9.</b>	Resumen de resultados de inducción a multipotencia de fibroblastos felinos con ácido valproico, 5-Azacidina y factores de crecimiento. Fuente: Elaboración propia.	75
<b>10.</b>	Tratamientos de reprogramación empleados en AMSCs de gato. Fuente: Elaboración propia.	76
<b>11.</b>	Resumen resultados obtenidos de la reprogramación de AMSC felinas con VPA + A8301 y 5-AZA + VITC + A8301 + h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.	82

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
1.	Fases de la reprogramación celular. Fuente: Modificado de David y Polo, 2014.	27
2.	Representación esquemática de la preparación del Plasma Rico en Plaquetas – PRP. Fuente: Elaboración propia.	38
3.	Dot blot para identificación de proteínas con cola de histidina. 1) sobrenadante obtenido del cultivo de las SIHA con 10% SFB sin pasar por filtro AMICON de 50, 2) sobrenadante obtenido del cultivo de las SIHA sin SFB y sin pasar por filtro AMICON de 50, 3) concentrado del sobrenadante pasado por AMICON 50 y 10 sin SFB, 4) concentrado del sobrenadante pasado por AMICON 50 y 10 con 10% SFB y pasado a través de la columna de afinidad, 5) concentrado del sobrenadante pasado por AMICON 50 y 10 sin SFB y pasado a través de columna de afinidad, 6) control positivo que corresponde a EGF marcado con cola de histidina. Fuente: Elaboración propia.	40
4.	Citometría de flujo para evaluar ciclo celular en fibroblastos dérmicos felinos bajo el efecto de h-PDGF-B. Eje Y= porcentaje de células en la fase indicada del ciclo. En el eje X se aprecian los grupos de tratamientos, 1) 0,5% SFB sin h-PDGF-B por 48 horas, 2) 0,5% SFB sin h-PDGF-B por otras 96 horas, 3) 0,5% SFB + h-PDGF-B y 4) 10% SFB + h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.	41
5.	Esquema de reprogramación de fibroblastos felinos empleando como recurso de factores de crecimiento Plasma Rico en Plaquetas, EGF o h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.	42
6.	Esquema de reprogramación de AMSCs empleando como factor de crecimiento h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.	42
7.	(a) Explante de piel de fibroblastos felinos al día 5 de cultivo. Magnificación 4x (panel izquierdo). (b) Cinética de crecimiento de los fibroblastos felinos empleados en el experimento (panel derecho) (n = 4). (c) Cinética de crecimiento de AMSCs (n = 4). Para comparar las diferencias en promedios de días de doblaje celular se empleó el test de Kruskal Wallis. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Fuente: Elaboración propia.	49
8.	Citometría de flujo para evaluar expresión de marcadores de superficie en	50

- fibroblastos y AMSC de gata doméstica. Fuente: Elaboración propia.
9. Expresión de marcadores de superficie CD44 y CD90 en fibroblastos y AMSC felinas. Para comparar las diferencias en promedios se empleó el test de Kruskal Wallis.\*p<0,05. Fuente: Elaboración propia. 50
  10. Expresión relativa de mRNA para OCT4 y NANOG en fibroblastos (n = 4) y AMSC (n = 4) de gato doméstico. Para comparar las diferencias en promedios se empleó el test de Kruskal Wallis. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05. Fuente: Elaboración propia. 51
  11. Ensayos de migración por Scratch y en transwell de AMSCs de gato. Figuras a y b corresponden a migración por Scratch; figuras c y d corresponden a los ensayos de migración en Transwell. Fuente: Elaboración propia. 52
  12. Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSCs de gato. (a) Expresión de PPAR $\gamma$  de células sometidas a ensayos de diferenciación adipogénica, se observa el control y las células diferenciadas con vacuolas lipídicas teñidas con Oil Red. (b) Expresión de Sox9 de células en diferenciación osteogénica, se observa el control y las células diferenciadas positivas a la tinción con rojo alizarina y (c) expresión de Aggrecan en células en ensayos de diferenciación condrogénica, se observa el control y el pellet formado positivo a la tinción con azul de alcian. Las diferencias en la expresión de los grupos control y diferenciado fue evaluada por medio de la prueba t. (n=4). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia. 53
  13. Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos de gata doméstica sometidos a diferentes tratamientos de reprogramación empleando VPA+PRP. (n=3). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD).\*p<0,05. Fuente: Elaboración propia. 55
  14. Expresión de marcadores de superficie CD44, CD90, CD105 y MHCII en fibroblastos felinos reprogramados con VPA+PRP. (n=3). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia. 56
  15. Inmunocitoquímica para Oct4 en fibroblastos felinos tratados con VPA+PRP. Los fibroblastos fueron positivos para la expresión de Oct4 al día 0 y al día 5 del tratamiento con VPA+PRP, observándose principalmente a nivel citoplasmático y 56

perinuclear. Para los marcadores de superficie Cd44 y Cd90 no se observó ninguna célula positiva para su expresión, ni en el grupo control o al día 5 del tratamiento con VPA+PRP. Se muestran las fotos negativas para Cd44 y Cd90 al día 5 de la reprogramación. Fuente: Elaboración propia.

16. Citometría de flujo para evaluar expresión de marcadores de superficie Cd44, Cd45, Cd90 y MHCII en fibroblastos de gato doméstico (línea 4) reprogramados con VPA+PRP. Fuente: Elaboración propia. 57
17. Ensayos de diferenciación a linajes mesodérmicos de los fibroblastos de gato doméstico bajo diferentes tratamientos de reprogramación. Línea 4 positiva para la tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. Fuente: Elaboración propia. 58
18. Inmunocitoquímica de vimentina para fibroblastos tratados con VPA+PRP. Se evaluó la expresión de vimentina en las líneas 4, 5 y 7 durante los días de tratamiento 0, 5 y 12 con VPA+PRP. En la línea 7 la imagen del día 12 no se documentó debido a desprendimiento de las células de la placa de cultivo. Fuente: Elaboración propia. 59
19. Expresión de OCT4, NANOG, CD44, CD90, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos de gato doméstico reprogramados con VPA+EGF (n=2). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05. Fuente: Elaboración propia. 61
20. Evaluación de la expresión de Oct4 por medio de inmunocitoquímica en fibroblastos dérmicos de gato reprogramados con VPA+EGF. Fuente: Elaboración propia. 61
21. Ensayos de diferenciación mesodérmica con fibroblastos de gato doméstico reprogramados con VPA+EGF. Ninguna de las líneas presentó positividad a las tinciones para diferenciación condrogénica (azul de alcian), osteogénica (rojo alizarina) y adipogénica (Oil Red). Fuente: Elaboración propia. 62
22. Expresión de genes OCT4, NANOG y marcadores de superficie para fibroblastos tratados con VPA+ h-PDGF-B. (n=1). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05. Fuente: Elaboración propia. 64
23. Inmunocitoquímica para evaluar expresión de Oct4 en fibroblastos reprogramados 65



con VPA+h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.

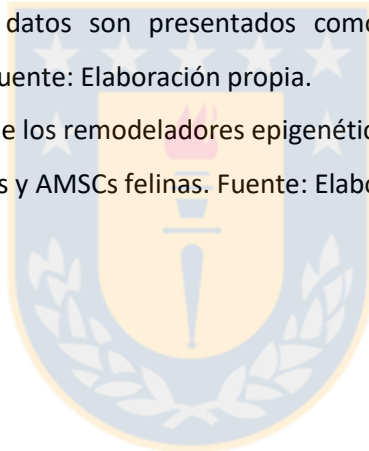
- 24.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con VPA + h-PDGF-B y expresión de genes Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$ . Tinción positiva con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0001. Fuente: Elaboración propia. 66
- 25.** Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos felinos bajo tratamiento con 5-AZA + PRP. El test de Kruskal Wallis fue empleado para evaluar diferencias entre los grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05. Fuente: Elaboración propia. 67
- 26.** Ensayos de diferenciación mesodérmica en fibroblastos felinos reprogramados con 5-AZA+PRP. Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba de Kruskal Wallis fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Fuente: Elaboración propia. 68
- 27.** Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos tratados con 5-AZA + h-PDGF-B. La prueba de Kruskal Wallis fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia. 69
- 28.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 2). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia. 71
- 29.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 3). Tinción con rojo alizarina para la 71

- diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia.
- 30.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 4). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia. 72
- 31.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 6). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia. 73
- 32.** Ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (UFC-F) para fibroblastos tratados con 4 factores. Las células fueron sembradas a 250, 500 y 1000 células/cm<sup>2</sup>. Un ANOVA de dos vías fue empleado para evaluar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia. 74
- 33.** Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina, SNAIL, CD44 y CD90 en las diferentes líneas AMSC de gato doméstico reprogramadas con VPA+A8301 (n=2). La prueba de Kruskal Wallis fue empleada para determinar diferencias entre grupos (n = 3). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . Fuente: Elaboración propia. 77
- 34.** Ensayos de diferenciación de AMSC sometidas a reprogramación con VPA+A8301. (n=3). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos 78

son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Fuente: Elaboración propia.

- 35.** Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie en AMSC felinas 79  
tratadas con 5-AZA+h-PDGF-B. (n=2) El test de Kruskal Wallis fue empleado para  
determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como  
promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Fuente:  
Elaboración propia.
- 36.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSC reprogramadas con 5-AZA + h- 80  
PDGF-B + A8301 + VITC. (n=2). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación  
osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la  
diferenciación adipogénica. El test de Kruskal Wallis fue empleado para determinar  
diferencias en la expresión de los genes de diferenciación entre los grupos  
tratamiento. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación  
estándar (SD). \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.
- 37** Resumen de los efectos de los remodeladores epigenéticos (VPA y 5-AZA) más el h- 95  
PDGF-B sobre fibroblastos y AMSCs felinas. Fuente: Elaboración propia.



## INTRODUCCIÓN

La reprogramación celular es una metodología empleada para modificar la expresión génica de diversos tipos celulares con fines en terapia celular, investigación básica, farmacología, preservación de recursos genéticos, derivación de gametos, desarrollo de animales transgénicos, inducción de modelos de enfermedad, entre otros (Bahamonde et al., 2018; Hua et al., 2009). Diversas moléculas y/o factores son empleados en los eventos de reprogramación, demostrando ser una alternativa para la obtención de células madre que evitan complicaciones de tipo ético y biológico como sucede con las células madre pluripotentes aisladas desde el embrión (ESC).

Gracias a la reprogramación celular, en el año 2006 Yamanaka y colaboradores revolucionaron el concepto de célula madre, con la obtención de células pluripotentes a partir de fibroblastos de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006). En su trabajo, este grupo demostró que era posible obtener células pluripotentes a partir de la transfección de células somáticas con los genes codificantes para los factores de pluripotencia OCT4, SOX2, KLF4 y C-MYC, los cuales inducen la reprogramación celular, que se inicia con la expresión endógena de dichos genes y el silenciamiento de los genes somáticos. De esta forma fue posible obtener células pluripotentes inducidas (iPSC) evadiendo los inconvenientes técnicos y éticos presentes en la obtención de las ESC.

Aunque las células madre se han clasificado principalmente en células madre adultas y embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) podrían considerarse como un tipo celular diferente pero con las características de una ESC. La diferencia entre las células madre adultas y las embrionarias radica en que las primeras tienen la capacidad de autorenovarse para regenerar órganos y tejidos, y las segundas sólo están presentes en las primeras fases del desarrollo embrionario y tienen el potencial de dar origen a cualquier linaje celular. Así mismo, se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de regeneración en totipotentes, pluripotentes, oligopotentes, multipotentes y unipotentes (Morgani y Brickman, 2014). Esta característica de generar diferentes tejidos de acuerdo a las necesidades del tejido blanco se describe como plasticidad (Lakshmiathy y Verfaillie, 2005). Gracias al aprovechamiento de esta cualidad y de las tecnologías de reprogramación existentes se ha hecho posible la obtención de células pluri, multipotentes o transdiferenciadas, buscando opciones terapéuticas tanto para humanos como para animales que presenten daños tisulares generados por traumas o degeneración. Las células utilizadas en terapéutica deben representar el mínimo riesgo de rechazo o de efectos secundarios en el paciente objetivo. Hasta el momento, aunque las iPSC representan un gran potencial para uso terapéutico, su principal limitación está ligada a posibles formaciones de tejido maligno por lo que las células madre mesenquimales (MSC) tienen un margen de seguridad terapéutica más amplio y por lo tanto son más empleadas (Yamanaka y Blau, 2010). Sin embargo, aunque las MSC que son obtenidas principalmente de médula ósea y tejido graso son regularmente utilizadas para tratamiento de lesiones locales, hay poca evidencia objetiva que permita demostrar que estas células se retienen en el lugar de las lesiones para contribuir directamente a la formación de tejido (Bianco, 2013). A pesar de la posibilidad de utilizar MSC con mayor seguridad, su nivel de potencia

restringe su uso a ciertas patologías, por lo cual las iPSC continúan siendo potencialmente más prometedoras en ese aspecto.

Para obtener una reprogramación exitosa, las células deben atravesar por una transición en la que se presenta un cambio en la expresión de genes y modificaciones morfológicas visibles. Esta transición se conoce como MET (transición mesenquimal a epitelial, por sus siglas en inglés) (Hemberger, Dean, y Reik, 2009; Li, Liang, y Ni, 2010; Li et al., 2010). Se ha evidenciado que en algunos puntos de esa transición las células poseen características relacionadas con su nivel de potencia que pueden ser aprovechadas. Chandrakanthan y colaboradores reportaron recientemente la generación de células madre multipotentes inducidas (iMSC) con capacidad regenerativa a partir de células somáticas terminalmente diferenciadas de humanos y murinos, utilizando factores de crecimiento derivados de plaquetas y un agente promotor de cambios epigenéticos, la 5-Azacitidina (5-AZA) (Chandrakanthan et al., 2016). La 5-AZA es un componente análogo nucleósido que demetila el ADN y es inductor de la plasticidad celular. Es comúnmente usado en protocolos de transdiferenciación y de obtención de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En este estudio realizado por Chandrakant et al., se demostró que las iMSC contribuían directamente a la regeneración de tejido in vivo sin formación de tumores. Pei y colaboradores también lograron un importante avance al obtener células madre mesenquimales a partir de fibroblastos dérmicos humanos con el uso de moléculas químicas y factores de crecimiento (Lai et al., 2017).

Tanto las MSC como las iPSC han sido aisladas de muchas especies animales, pero sólo las MSC han sido empleadas en terapias veterinarias con resultados prometedores, incluso terapias alogénicas en equinos, caninos y felinos vía intravenosa han sido bien toleradas (Kol et al., 2015; Park et al., 2013; Wood et al., 2012). Adicional a esto, los modelos animales son útiles para comprender y estudiar muchas enfermedades humanas que son de ocurrencia en otras especies y representan la fase inicial de experimentación antes de que las terapias pasen a fase experimental a humanos, circunstancia que impulsa la investigación en terapia celular en animales domésticos principalmente.

En felinos se han implementado tratamientos con células madre mesenquimales para terapias regenerativas con buenos resultados, en patologías como la falla renal crónica, gingivoestomatitis felina, asma felino y enteropatías (Arzi et al., 2016; Quimby et al., 2015; Trzil et al., 2015; Webb y Webb, 2015). Si bien se han logrado importantes resultados en el área de iPSC en animales, no ha sucedido lo mismo para iPSCs de felinos (Ezashi, Yuan, y Roberts, 2016). Las pocas publicaciones existentes hacen referencia a felinos en vía de extinción o amenazados, de los cuales se logró obtener un estado de reprogramación importante con una finalidad encaminada a la conservación de dichas especies (Verma et al., 2012; Verma et al., 2013).

Por otra parte, las MSC felinas se han aislado en gato doméstico, gato patinegro (*Felis nigripes*), una especie amenazada (Gómez et al., 2015) y guiña (*Leopardus guigna*; Echeverry et al., 2019). En felinos se ha reportado el aislamiento de MSC de médula ósea, tejidos fetales y tejido adiposo, siendo este último el más eficiente en cultivo y de fácil obtención, además presentan un potencial

de diferenciación hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos y células neuronales (Gómez et al., 2015). Este último dato obtenido por Gómez y colaboradores refleja la plasticidad de las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo en los felinos, además de la expresión de genes de pluripotencia como NANOG, OCT4, y KLF4, siendo NANOG el de mayor expresión y determinante para la reprogramación de células felinas (Verma et al., 2013, Gómez et al., 2015). Presumiblemente, los mecanismos de reprogramación y de epigenesis en células felinas podrían ser más complejos que en otras especies, pero frente a esta presunción aún no existen estudios que afirmen o contradigan esta teoría. Quedan al respecto muchos cuestionamientos sin resolver sobre vías de señalización que deben ser activadas en la reprogramación de células somáticas felinas para inducir diferentes niveles de potencia.

Podría presumirse que existen diferencias en la inducción a multi o pluripotencia al utilizar diferentes tipos de células felinas y que cada linaje celular presenta una plasticidad diferente, pero no hay datos que permitan afirmar esto. Sin embargo, la expresión de algunos genes relacionados con la pluripotencia en fibroblastos dérmicos felinos sugiere que esas células tienen la plasticidad para ser reprogramadas. Se ha demostrado que la eficiencia del evento de reprogramación puede facilitarse con la presencia de moléculas específicas en el medio de inducción. Algunas de estas moléculas facilitadoras son el ácido valproico (un inhibidor de deacetilasa de histonas; HDAC), 5-AZA (un inhibidor de DNMT mencionado anteriormente), butirato (inhibidor de HDAC), vitamina C (antioxidante, inductor de la expresión de NANOG e inhibidor de apoptosis), factores de crecimiento, CHIR99021 (inhibidor de la molécula GSK-3b), PD0325901 (inhibidor de MEK/ERK), entre otros (Lin y Wu, 2015; Nie et al., 2012; Zhang et al., 2012). El uso de estas moléculas que ejercen influencia en la expresión génica y pueden modificar indirectamente la función celular se ha planteado como una herramienta para la obtención de células de importancia médica.

Hasta el momento el tejido adiposo ha sido el más empleado para aislamiento de MSC para terapia celular en gato doméstico (Kono et al., 2014). Sin embargo, se limita cuando los pacientes presentan estados caquéticos o patologías en las cuales una inducción anestésica profunda se hace riesgosa. En contraste, en felinos silvestres aislar tejido adiposo u otro tejido fuente de MSC resulta mucho menos probable de conseguir. En este caso, la posibilidad de obtener MSC a partir de otros recursos menos invasivos y riesgosos para los felinos en teoría puede ser alcanzable si se emplean medios condicionados que aprovechen la plasticidad de las células diferenciadas felinas, pudiendo ser empleadas en terapias celulares y aplicaciones biotecnológicas dirigidas a felinos domésticos y silvestres.

El laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Concepción cuenta con un banco de células (fibroblastos dérmicos) de algunos gatos salvajes las cuales han sido obtenidas y criopreservadas en pases tempranos con la finalidad de ser utilizadas en clonación. Sin embargo, estas células pueden ser empleadas para evaluar plasticidad y protocolos de reprogramación celular enfocados a la obtención de iMSC. Esto permitiría no sólo obtener células con un nivel de potencia mayor para ser aprovechadas en técnicas de reproducción asistida como la transferencia nuclear de células somáticas y derivación de gametos, también representan una posible opción para terapia celular para ejemplares de la misma especie que se encuentran en rehabilitación o

cautiverio. Hasta la fecha ningún estudio sobre la plasticidad de células somáticas felinas en medios condicionados con moléculas reprogramadoras ha sido realizado en gatos domésticos o silvestres. Adicionalmente, la información disponible sobre reprogramación en felinos es escasa, desconociendo como puede modificarse la expresión de determinados genes de pluripotencia y marcadores de superficie y como la expresión o represión de alguno de estos genes, aparte de Nanog, puede significar el éxito o fracaso de una reprogramación o modificación epigenética de células terminalmente diferenciadas.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la plasticidad de fibroblastos y MSC felinas bajo tratamientos de reprogramación con modificadores epigenéticos y factores de crecimiento y evaluar dicho efecto en la expresión de genes de pluripotencia como OCT4 y NANOG, expresión de marcadores de superficie y capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos.



## REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1. Terapia celular

En medicina humana y veterinaria el campo de investigación en células madre avanza constantemente tanto a nivel clínico, como experimental, aumentando la disponibilidad de células para una administración segura y en forma rápida en varias enfermedades.

La terapia celular en felinos tiene un potencial en el tratamiento de diversas patologías principalmente de tipo inflamatorio. Hasta el momento, las MSC han sido evaluadas en terapias para enfermedades inflamatorias, degenerativas e inmunomediadas en felinos. Aunque las iPSCs son consideradas como la mejor opción a futuro para el tratamiento de estas patologías, aún no están disponibles en gatos domésticos.

Las iPSCs felinas representan posibilidades como modelo animal de terapia celular para la comprensión y estudio de patologías como el VIH, enfermedad renal crónica y Alzheimer (Gómez y Pope, 2014). Aún una opción terapéutica con iPSCs no se ha considerado en esta especie, en primer lugar por la carencia de reportes en la obtención de estas células en gato doméstico y en segundo lugar porque aún existe el riesgo de que las iPSCs generen teratomas en los pacientes por lo que otros recursos de células madre para terapia son requeridos en esta especie.

Así mismo, las iPSCs en felinos salvajes representan la posibilidad de preservación de especies amenazadas y en peligro de extinción (Gómez y Pope 2014). Mientras tanto, las MSC arrojan resultados interesantes en el tratamiento de enfermedades felinas que generalmente no responden al manejo farmacológico tradicional.

#### 1.1 *Los felinos como modelo de enfermedad y objeto de estudio*

El gato doméstico es un excelente modelo animal de enfermedad para comprender patologías tanto en humanos como en la misma especie. La secuenciación del genoma del gato doméstico revela una similitud del 90% con los genes humanos y se ha identificado en el genoma de esta especie variantes genómicas que pueden ser utilizadas para determinar las bases genéticas de enfermedades hereditarias comunes (Pontius et al., 2007). Los gatos domésticos poseen 250 trastornos hereditarios, muchos similares a las patologías genéticas humanas. En esta especie se presenta también una enfermedad similar al SIDA, el virus de inmunodeficiencia felina, que puede cursar con neoplasias linfoides que también son comunes en humanos (Maggio et al., 1978); también se reporta en gatos adultos el Alzheimer como un desorden similar por la deposición de placas amiloideas (Siebelink et al., 1990; Willet et al., 1997). Estas características hacen al gato un modelo más cercano al humano que los modelos en ratones. Por otro lado, el gato presenta patologías como la enfermedad renal crónica, osteoartritis, enfermedades inflamatorias del intestino y la gingivoestomatitis felina crónica que merecen ser también investigadas y para las



cuales las terapias con células madre pueden ser prometedoras (Arzi et al., 2015; Quimby et al., 2013).

El gato doméstico es uno de los pacientes más frecuentes en la consulta de especies menores con dolencias asociadas a enfermedades virales, del tracto gastrointestinal, enfermedad renal, enfermedad hepática, dermatitis, entre otras. Algunas de estas patologías representan un constante desafío para el médico tratante por las limitaciones a nivel terapéutico que ellas implican y frente a las cuales los tratamientos tradicionales tienen baja efectividad. Las células madre mesenquimales son actualmente una opción terapéutica viable y con casos puntuales exitosos para algunas enfermedades.

Dentro de estas patologías se encuentra la enfermedad renal crónica felina, una condición bastante común diagnosticada principalmente en gatos adultos y en algunos felinos silvestres, la cual está caracterizada por inflamación túbulo-intersticial, atrofia tubular y fibrosis intersticial con subsecuente pérdida de la función renal (DiBartola et al., 1987). Algunos estudios recientes sugieren que el uso de las MSC puede mejorar la función renal a través de la incorporación en el parénquima renal de las mismas que conlleva a un aumento en la generación de nuevas células tubulares renales. Adicional, las MSC tienen un efecto mediador de la inflamación y efecto antifibrótico que indirectamente puede mejorar la función renal (Lee et al., 2010). Este efecto mediador de la inflamación se atribuye a la inhibición en la proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, supresión de la función de las células dendríticas, supresión de la producción de interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) por las células natural killer (NK). Los investigadores Quimby y Webb han conducido numerosos tratamientos con MSC en pacientes felinos con enfermedad renal crónica y reportan una ligera mejoría en los parámetros de función renal y resultados muy variables entre los pacientes sometidos a tratamientos con MSC (Quimby et al., 2015; Quimby y Dow, 2015; Quimby et al., 2013; Webb y Webb, 2015).

La enteropatía crónica, generalmente asociada a alergias alimenticias, se caracteriza por inflamación del intestino como resultado de una respuesta inmunitaria exacerbada que conlleva a una intolerancia a antígenos que se encuentran en el tracto intestinal. Los pacientes generalmente requieren medicación de corticoides de por vida como tratamiento paliativo. El tratamiento de pacientes con MSC para esta condición reportó una marcada disminución de los signos clínicos después de dos meses de iniciado el tratamiento comparado con el grupo control, por lo que se concluye que es uno de los tratamientos más efectivos con MSC en patologías felinas (Webb y Webb, 2015).

La gingivoestomatitis crónica felina (GECF), cuadro asociado a una reacción anormal del sistema inmune, es otra patología blanco del tratamiento con MSC. La GECF es una enfermedad inflamatoria difusa de la cavidad oral, la mucosa gingival y del resto del epitelio bucal que puede ser leve, moderada o grave (Castro-López et al., 2011). Esta enfermedad está asociada también a la alimentación del gato con dieta blanda, falta de higiene dental y enfermedades que afectan el sistema inmune como el SIDA y Leucemia Felina. Los tratamientos para la GECF consisten en exodoncia parcial o completa, corticoides, analgésicos y antibióticos con un pronóstico reservado

(Castro-López et al., 2011). Se han reportado algunos casos exitosos de gatos tratados con MSC para esta patología que presentaron una recuperación satisfactoria (Arzi et al., 2015).

Gómez et al (2015) reportan el potencial de diferenciación neurogénico de las AMSC, lo que también representa una posible opción terapéutica para enfermedades de tipo neurodegenerativas en felinos (Gómez et al., 2015). Estudios realizados en humanos han demostrado algunas mejorías en pacientes con lesiones medulares, los cuales han recuperado entre un 20 y un 50% de su sensibilidad y movilidad (Huang et al., 2014). En los gatos existen algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas a factores inflamatorios de origen infeccioso o traumático, que pueden ser un blanco para tratamiento con células madre mesenquimales o iPSC para favorecer la capacidad regenerativa de este tejido. En lesiones de la médula espinal la regeneración completa requiere producción de nuevas neuronas y células de la glía y una correcta re-inervación de los blancos para restaurar la función. El descubrimiento de células madre residentes en el sistema nervioso genera expectativas respecto a nuevas terapias celulares y estudios recientes revelan el mecanismo de acción de las MSC en la médula espinal canina, el cual consiste en la regulación de la expresión de ARN y proteínas que participan en la regulación de los mecanismos anti-inflamatorios. En los estudios conducidos con injuria en la médula espinal se ha evaluado la inyección intravenosa e intramedular con resultados muy variados por lo cual aún se considera un desafío definir cuál es el mejor método de administración de las MSC para este tipo de tratamientos (Wood et al., 2012).

Las MSC son también un potencial terapéutico para algunas patologías oftálmicas en felinos. Una de estas patologías es la queratoconjuntivitis seca que ocurre como resultado de la destrucción inmunomediada del tejido lagrimal y puede desencadenar úlcera corneal. En perros se ha demostrado que las MSC cuando son inyectadas a nivel peri ocular residen cerca del lugar de inyección alrededor de 2 semanas (Wood et al., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado la seguridad y eficacia en esta especie de administrar tanto células autólogas como alogénicas in situ sin efectos secundarios (Park et al., 2013).

Las terapias con MSC han sido aplicadas principalmente en caninos y equinos para el tratamiento de enfermedades de origen traumático o degenerativo que afectan el sistema músculo esquelético, en gatos domésticos estas patologías, por lo menos las de tipo degenerativo que afectan el sistema músculo esquelético, no son muy frecuentes, pero podrían aplicarse este tipo de terapias en casos de lesiones de origen traumático (Fortier y Travis, 2011).

Las células madre también son una fuente prometedora para tratamiento de enfermedades hepáticas, cardíacas, diabetes, enfermedades sanguíneas y de médula ósea en animales de compañía (Gattegno-Ho et al., 2012). De estas patologías, en gatos domésticos es frecuente encontrar casos de diabetes asociados a sobrepeso, similar a la diabetes tipo II en humanos. Este tipo de diabetes se caracteriza por resistencia a la insulina y daño de las células beta del páncreas (Nelson y Reusch, 2014).

**Tabla 1.** Tipo de tratamiento, patología, dosis y vías de administración de MSC en felinos.

<b>Especie</b>	<b>Dosis</b>	<b>Vía administración</b>	<b>Patología</b>	<b>Rango de edad</b>	<b>Tipo tratamiento</b>	<b>Referencia</b>
<b>Gato doméstico</b>	3 dosis de $2 \times 10^6$ Células/kg	Intravenosa	Falla renal crónica	10-15 años	Alogénico	(Quimby et al., 2015)
<b>Gato doméstico</b>	2 dosis de $2 \times 10^6$ Células/kg	Intravenosa	Enteropatía	7-15 años	Alogénico	(Quimby et al., 2013)
<b>Gato doméstico</b>	1 dosis de $5 \times 10^6$ Células/kg	Intravenosa	Gingivostomatitis	1-14 años	Autólogo	(Arzi et al., 2016)
<b>Perro doméstico</b>	6 dosis de $2 \times 10^6$ Células/kg	Periocular	Ensayo clínico	11-14 meses	Autólogo	(Park et al., 2013)
<b>Perro doméstico</b>	6 dosis de $5 \times 10^6$ Células/kg	Intrarticular	Ensayo clínico	11-14 meses	Autólogo	(Park et al., 2013)
<b>Equino</b>	3 dosis de $25 \times 10^6$	Intravenosa	Ensayo clínico	5-14 años	Alogénico	(Kol et al., 2015)

Fuente: Quimby et al., 2013; Quimby et al., 2015; Arzi et al., 2016; Park et al., 2013 y Kol et al., 2015.

## 2. El concepto de célula madre

El término de células madre ha cobrado interés desde el auge de la terapia génica y la clonación. Sin embargo, el término se conoce desde el año 1916, y fue acuñado por Danckhoff cuando describió la presencia de una célula precursora de todas las células presentes en la médula ósea (Danckhoff, 1916). Hoy se denomina a las células madre como aquellas células que tienen la capacidad de autorenovación indefinida y se pueden diferenciar hacia diferentes linajes con características y funciones determinadas (Donovan, 2001). Así mismo, se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de regeneración y diferenciación en totipotentes, pluripotentes, oligopotentes, multipotentes y unipotentes (Morgani y Brickman, 2014).

Las principales características de una célula madre son:

- a) Su capacidad de autorenovación que le permite proliferar extensivamente.
- b) La clonogenicidad, que hace referencia a la capacidad de replicarse a partir de una sola célula.
- c) Potencia, que es la habilidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares.

Estas propiedades de las células madre pueden diferir entre varios tipos de células. Es así como las células madre embrionarias (ESCs) derivadas del macizo celular interno del blastocito tienen una mayor capacidad de autorenovarse que las células madre adultas que pueden proliferar exitosamente, pero sólo se pueden diferenciar en células de tejidos específicos (Denham et al., 2005). Las ESCs pueden dar origen a las tres capas germinativas que son el endodermo, mesodermo y ectodermo. Órganos específicos se pueden originar de cada una de estas tres capas. Sin embargo, algunas de las células progenitoras que ha contribuido a la formación de órganos y que están indiferenciadas son retenidas en nichos de células madre y pueden ser encontradas en médula ósea, sangre, músculo, hígado, cerebro, tejido adiposo, piel y tracto gastrointestinal (Denham et al., 2005). Este nicho que corresponde a células progenitoras se encuentra generalmente en un estado latente y puede dar lugar a la diferenciación terminal y especializada de células del tejido u órgano al que pertenece en circunstancias de lesión o injuria (Falanga, 2012). Sin embargo, esto puede tener una manifestación diferente dependiendo del tejido del cual la célula es progenitora (Denham et al., 2005; Falanga, 2012). En el caso de la médula ósea, hígado, pulmón e intestino, las células madre son más activas y proliferan regularmente porque son tejidos de recambio constante y responden también proliferando rápidamente frente a alguna lesión. Mientras que en órganos como el páncreas, el corazón o el sistema nervioso la proliferación de las células madre se da precedida por una injuria para reemplazar tejido dañado (Angelini et al., 2004; Bouwens, 1998; Falanga, 2012; Mansergh et al., 2007).

Las células madre multipotentes se encuentran en la mayoría de tejidos y pueden bajo condiciones naturales diferenciarse en células de una sola capa germinativa. Por lo tanto su capacidad de diferenciación es más reducida respecto a las células madre pluripotentes (Sehwon y Piedrahita, 2014). Las MSCs son las células multipotentes más reconocidas y pueden ser derivadas de una amplia variedad de tejidos incluyendo la médula ósea, tejido adiposo, hueso, cordón umbilical, sangre periférica, entre otros (Augello et al., 2010).

### **3. Células madre embrionarias (ESC)**

Las etapas iniciales del desarrollo embrionario de mamíferos ocurre a través de varias etapas de división celular que van desde mórula hasta el blastocito, este último se caracteriza por tener formado en su interior la masa celular interna (ICM), población celular que se mantiene temporalmente pluripotente antes de que haya lugar a la formación de las tres capas germinales primitivas, estas células son las que se conocen como células madre embrionarias (ESC) (Lawson et al., 1991). La derivación de ESC ha sido compleja en otras especies diferentes a los murinos, especialmente en animales domésticos. Las primeras líneas ESC fueron generadas desde el ICM de blastocitos de una línea de ratón específica (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Tales células formaron colonias que aparecen en forma de montículo, y se propagaron en medio que contiene LIF y suplementado con FBS (Williams et al., 1988). Las ESC obtenidas de blastocitos humanos son fenotípicamente diferentes de las obtenidas de ratón (Hanna et al., 2010; Thomson et al., 1998). Las ESC humanas forman colonias planas cuando crecen en un sustrato de matriz artificial, como el

matrigel y requieren FGF2 y factores de crecimiento que operan a través de las vías de señalización del receptor Activina/TGF- $\beta$  y la activación de los factores de transcripción SMAD2 y SMAD3 (Amit et al., 2004; Ludwig et al., 2006). A pesar de estas diferencias ambiguas, se establecieron tres criterios de pluripotencia para las ESC humanas que son, la habilidad para diferenciarse in vitro en las tres capas germinales que se evalúa con la formación de teratomas bien diferenciados; formación de cuerpos embrioides cuando se cultivan en placas que no favorecen la adhesión. Y por último, la autorenovación, un estado indiferenciado de ESC derivadas de epiblasto, que también depende de la expresión de muchos genes de pluripotencia asociados con ESC de tipo naïve (Parfitt y Shen, 2014).

Las ESC-like de animales domésticos se han obtenido de especies como los porcinos, caninos, bovinos, ovinos, caprinos y gatos. Sin embargo, no se han identificado ESC homólogas a las descritas para los roedores y primates en estas otras especies (Chazaud et al., 2006; T Ezashi et al., 2012; Gonçalves, Ambrósio, y Piedrahita, 2014; Koh y Piedrahita, 2014; Malaver-Ortega et al., 2012; Nowak-imialeket al., 2011).

En el gato doméstico, las células madre tipo embrionarias (ESC) aisladas de la ICM de blastocitos producidos in vivo son las únicas células pluripotentes que se han generado en esta especie (Gómez et al., 2010; Yu et al., 2008). Las ESC de gato pueden proliferar hasta el pase 12, pero pierden progresivamente su capacidad de autorenovación y se pueden diferenciar de forma espontánea en cultivo. A su vez, estas células expresaron algunos de los marcadores estándares de pluripotencia como son Oct4, SSEA-1, Nanog y Sox2 y fueron capaces de diferenciarse a mesodermo y ectodermo in vitro, aunque fallaron para formar teratomas.

#### **4. Células madre mesenquimales (MSC)**

Las células madre mesenquimales (MSC), también denominadas por algunos autores como células estromales mesenquimales, son células no especializadas que presentan una forma típica fibroblastoide, tienen la capacidad de autorenovarse por división celular constante durante largo tiempo y diferenciarse a células especializadas (Caplan, 1991; Ryan et al., 2005a). Las MSCs participan en la regeneración de tejido por medio de mecanismos distintos como contribuir directamente a la reparación del tejido por diferenciación en fenotipos celulares específicos como, ligamentos, tendones o fibroblastos de forma alternativa pero no necesariamente excluyente; por producción de matriz extracelular y proteínas bioactivas como factores de crecimiento, factores antiapoptóticos y agentes quimiotácticos que tienen un efecto importante en las dinámicas celulares, producción de efectos anabólicos, estimulación de la neovascularización y reclutamiento adicional de células madre en el sitio de la lesión. Las células madre reclutadas en estos sitios pueden diferenciarse y/o producir péptidos activos biológicamente (Dahlgren, 2009). En medicina veterinaria la caracterización de células madre mesenquimales es un poco más difícil debido a la baja especificidad o afinidad de los anticuerpos disponibles que generalmente son hechos contra antígenos humanos o murinos.

Según el Comité de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) se proponen unos los siguientes criterios mínimos para definir células madre mesenquimales humanas:

1. Las MSC deben ser adherentes al plástico cuando son mantenidas en condiciones estándar de cultivo (medio esencial mínimo más 10-20 % de suero fetal bovino).
2. Las MSC deben expresar las moléculas de superficie CD105, CD73 y CD90 y ser negativas para la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 y HLA-RD
3. Diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos in vitro.

A pesar de este consenso para la definición de MSC, algunos autores reportan otros marcadores de superficie que expresan las MSC de origen felino de acuerdo al tipo de tejido (Tabla 2). Esta diferencia en los marcadores de superficie puede deberse a características específicas del tejido del cual derivan las MSC. Una característica adicional reportada en MSC de gato derivadas de tejido adiposo es que expresan genes de pluripotencia como NANOG, KLF4 y OCT4 (Gómez et al., 2015).

**Tabla 2.** Expresión de marcadores de células madre mesenquimales derivadas de diferentes tejidos en felinos.

	Tejido adiposo	Médula ósea	Membranas y fluidos fetales	Referencia
POS	CD90	CD90	CD90	<i>Webb et al., 2011, Iacono et al., 2012, Kono et al., 2014, Arzi et al., 2015, Gómez et al., 2015.</i>
	CD44	CD44	CD44	<i>Webb et al., 2011, Iacono et al., 2012, Kono et al., 2014, Arzi et al., 2015.</i>
	CD105	CD105	CD105	<i>Webb et al., 2011, Iacono et al., 2012, Kono et al., 2014, Arzi et al., 2015, Gómez et al., 2015.</i>
	CD146			<i>Gómez et al., 2015.</i>
		CD271		<i>Lin et al., 2012.</i>
NEG	CD4	CD4		<i>Webb et al., 2011.</i>
	CD14		CD14	<i>Iacono et al., 2012, Kono et al., 2014, Gómez et al., 2015</i>
	CD18			<i>Arzi et al., 2015.</i>
	CD34		CD34	<i>Iacono et al., 2012, Kono et al., 2014.</i>
	CD45		CD45	<i>Iacono et al., 2012, Kono et al., 2014, Gómez et al., 2015</i>
	CD73		CD73	<i>Iacono et al., 2012, Gómez et al., 2015.</i>
	CD271			<i>Gómez et al., 2015.</i>
	MHC II	MHC II		<i>Webb et al., 2011, Arzi et al., 2015, Gómez et al., 2015.</i>

Fuente: Webb et al., 2011; Iacono et al., 2012; Kono et al., 2014; Arzi et al., 2015 y Gómez et al., 2015.

#### 4.1 Tejidos fuente de células madre mesenquimales (MSC)

Existen diferentes tejidos que representan un potencial recurso para la obtención de MSC tanto en animales como en humanos. En este orden, la médula ósea fue el primer tejido explorado, una de las mejores fuentes de obtención y hasta ahora la más empleada en terapia celular. Sin embargo, otras fuentes, como el tejido adiposo, han sido investigadas y usadas con éxito. En el campo de la medicina veterinaria la fuente de obtención de estas células es determinante dependiendo de la especie objetivo, ya que puede influir el peso, el tamaño y la facilidad de manipular al paciente para la obtención del tejido. Sin embargo, la facilidad de la obtención del tejido no siempre se correlaciona con una buena fuente de MSC. Por lo tanto la investigación de otros recursos para obtención de MSC en las diferentes especies es importante, teniendo en cuenta que tampoco se pueden extrapolar en todos los casos los resultados entre especies.

##### 4.1.1 Médula ósea

El aislamiento de MSC de médula ósea ha sido descrito en varias especies animales como murina, cunícula, equinos, porcinos, bovinos, caninos y felinos (Bosnakovski et al., 2005; Martin et al., 2002; Ringe et al., 2002; Tropel et al., 2004; Vidal et al., 2007). En este tejido se pueden encontrar células madre mesenquimales y una alta cantidad de células madre hematopoyéticas, teniendo en cuenta que las MSC tienen la capacidad de adherirse al plástico y presentan una morfología variada que incluye células multinucleadas y células mononucleares en forma de huso (Vidal et al., 2006). Algunos autores reportan que la calidad de las MSC disminuye a través de los continuos pasajes celulares pero pueden ser mantenidas por largos períodos de tiempo. Existen también diferencias significativas en la morfología entre la misma especie ya que se reporta en individuos maduros que la médula ósea es la mejor fuente de células madre tanto en humanos como en animales, pero parece ser que la tasa de formación de colonias de MSC de médula ósea en ratas y humanos es más baja que la de otras MSC derivadas de otros tejidos, ya que las colonias primarias de tejido sinovial, periostio, tejido adiposo y tejido muscular parecen ser mucho mayores (Koerner et al., 2006; Yoshimura et al., 2007). Estas células presentan buen potencial de diferenciación en general, son positivas para la expresión de CD9, CD29, CD44, CD90, CD105 y MHCI (Bosnakovski et al., 2005; Martin et al., 2002; Ringe et al., 2002; Tropel et al., 2004; Vidal et al., 2007). Maciel y colaboradores realizaron un estudio sobre la morfología de las MSC derivadas de médula ósea en felinos y observó la predominancia de dos tipos de células, las fusiformes y las alargadas.

Por otro lado, la médula ósea como fuente de MSC presenta la complicación de que su obtención en general resulta dolorosa y se pueden presentar riesgos de hemorragia e infección dependiendo de la especie que se esté interviniendo. En humanos se ha demostrado la persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en nichos de MSC derivadas de médula ósea (Garhyan et al., 2015).



#### 4.1.2 Sangre periférica

La sangre periférica es otro tejido de los cuales se ha documentado la obtención de MSC. Comparada con la médula ósea es un recurso más seguro y en teoría menos doloroso y con menos complicaciones pos intervención, además para la obtención de sangre periférica no se requiere emplear técnicas especializadas. La desventaja que tiene este recurso es que el aislamiento y proliferación de células de tipo fibroblastoide requiere de técnicas más complejas. En ratones, hámsteres, conejos, ovejas y caballos, se ha podido estandarizar un protocolo eficiente de aislamiento para este tipo celular (He et al., 2007; Koerner et al., 2006; Letouzey et al., 2015; Lyahyai et al., 2012; Valenti et al., 2008). Sin embargo en humanos, perros y gatos ha sido poco eficiente su aislamiento (Huss et al., 2000). Estas células tienen la capacidad de formar colonias fibroblastoides, aunque su potencial de diferenciación parece ser inferior a las células obtenidas de otras fuentes y su capacidad de proliferación disminuye alrededor del quinto pasaje para la mayoría de especies (Fu et al., 2015). En felinos estas células expresaron marcadores de superficie CD44 y CD90, presentaron capacidad de diferenciación mesodérmica pero no se reporta si expresan genes de pluripotencia como Oct4 y Nanog (Sato et al., 2016).

#### 4.1.3 Cordón umbilical

El cordón umbilical es una buena fuente para el aislamiento de MSC de especies de interés veterinario (Kern et al., 2006; Passeri, 2009; Reed y Johnson, 2008). Desde el cordón umbilical se pueden aislar células de la sangre presente en éste y de células del tejido conocido como gelatina de Wharton. Estos tejidos se colectan al nacimiento, generalmente sin complicaciones. Las MSC derivadas de cordón o sangre umbilical presentan ligeras diferencias con las MSC adultas y una aparente mayor plasticidad ya que pueden diferenciarse en hepatocitos además de los tipos celulares característicos de mesodermo y endodermo; adicionalmente expresan Oct4, SSEA-4, c-kit, CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, y proliferan fácilmente en cultivo (Koch et al., 2007). Comparado con otras fuentes de MSC, el número de células derivadas de la sangre de cordón umbilical es muy bajo y presenta una baja tasa de formación de colonias fibroblastoides. Las MSC derivadas de cordón umbilical de porcinos, caprinos, caninos y bovinos expresan altos niveles de actividad telomerasa que al parecer no altera la organización cromosomal (Cardoso et al., 2012; Filioli-Uranio et al., 2011). Las células de cerdos, búfalos y caballos derivadas de cordón umbilical resultaron positivas para genes de pluripotencia Oct4, Nanog y Sox2 en diferentes pasajes celulares (Carlin et al., 2006; Hoynowski et al., 2007; Mitchell et al., 2003; Singh et al., 2013; Sreekumar et al., 2014). Diferentes autores concuerdan en que la expresión de Oct4 en MSC derivadas de cordón umbilical de perros se va perdiendo a medida que avanzan los pasajes celulares. Adicionalmente, Lee y colaboradores plantean que la expresión de Nanog y Sox2 está negativamente correlacionada con el número de pasajes (Lee et al., 2011).



#### 4.1.4 Membranas fetales

El interés por las MSC derivadas de tejidos fetales y extraembrionarios ha incrementado debido a su utilidad en el campo de la medicina regenerativa (Csaki et al., 2007; Dahlgren, 2009; Hoynowski et al., 2007; Prockop et al., 2003; Ryan et al., 2005b). Estas células tienen la habilidad de diferenciarse en múltiples linajes bajo condiciones específicas y pueden ser adquiridas bajo métodos no invasivos y son exentas de complicaciones éticas debido a que estos tejidos son frecuentemente descartados después del nacimiento (Agung et al., 2006; Koch et al., 2007; Yoshimura et al., 2007). La membrana amniótica es ampliamente usada en ingeniería de tejidos para promover nueva epitelización y reconstrucción de la superficie ocular (Koerner et al., 2006; Vidal et al., 2006). Las membranas amnióticas comprenden dos tipos celulares, las células madre epiteliales amnióticas que recubren la superficie interna del amnios y células madre mesenquimales amnióticas (AMSCs) que están dispersas a través del estroma. Dadas sus propiedades inmunomodulatorias, funciones antiinflamatorias y no tumorigénicas, las AMSCs son una prometedora herramienta en terapia y medicina regenerativa (Csaki et al., 2007; Hoynowski et al., 2007; Vidal et al., 2007). Algunos estudios previos han caracterizado las células derivadas de la membrana amniótica de humanos, bovinos, equinos, ovinos, ratas, caninos y felinos (Bosnakovski et al., 2005; Kadiyala et al., 1997; Koch et al., 2007; Kulterer et al., 2007; Martin et al., 2002; Reed y Johnson, 2008; Ringe et al., 2002; Smith et al., 2003).

En los felinos, así como en otras especies, ese tejido es descartado después del nacimiento. Se han aislado exitosamente MSC con morfología fibroblastoide y una alta capacidad de autorenovación. En el pasaje 3 de estas células felinas se ha reportado que presentan un nivel de homogeneidad adecuado, como también se ha encontrado en los caninos (Vidane et al., 2014). A diferencia de otros tejidos, la población celular de las AMSC felinas incrementa considerablemente después del pasaje 7, siendo valores mayores a los reportados en equinos y caninos, donde el número de células tiende a incrementar conforme incrementa el número de pasajes celulares (Vidane et al., 2014). Adicionalmente, la viabilidad de estas células en criopreservación fue similar a la viabilidad presentada en las células frescas, por lo que son ideales para bancos celulares y futuras aplicaciones en terapia celular en felinos al igual que en otras especies (Vidane et al., 2014). Las AMSCs de gatos en el cultivo primario tienden a formar pequeños grupos de células cuando se cultivan a una alta densidad, esto sugiere que existe una fuerte señalización cuando se presenta el contacto célula-célula indicando que los efectos autocrinos y paracrinos juegan un rol importante en el desarrollo de las MSC (Iacono et al., 2015).

Las AMSCs de felinos expresan marcadores específicos CD73 y CD90 pero no marcadores específicos hematopoyéticos CD34, CD45 y CD79 (Vidane et al., 2014). Estos datos confirman que desde la membrana amniótica de felinos se pueden aislar MSC exitosamente sin contaminación con sangre o debris. La desventaja de estas células reportadas por el estudio es que al pase 4 presentaron una alta expresión de CD34, lo que es inconsistente con datos reportados en humanos. Este hallazgo sugiere que AMSCs pueden tener algún potencial angiogénico. En equinos se reportó el mismo hallazgo de la positividad de CD34 en el pase 5 (Alviano et al., 2007; Iacono et al., 2012; Iacono et al., 2015; Lage-Consiglio et al., 2012).

Sumado a las características ya mencionadas, las AMSCs de felinos son de interés en terapia celular debido a sus propiedades inmunomoduladores, fácil accesibilidad, fácil cultivo, potencial de diferenciación a otros linajes celulares. Estudios previos han reportado una alta plasticidad de las MSC derivadas de diferentes órganos post-natales. Cuando las AMSCs de gato fueron inyectadas en ratones inmunodeficientes (BALB/c-Un) ningún tumor fue generado en las 4 semanas siguientes a la inyección y los animales sobrevivieron a la inyección de las células sin ninguna complicación o respuesta inmune (Vidane et al., 2014).

#### 4.1.5 Tejido adiposo

El tejido adiposo a nivel corporal comparado con otros tejidos es bastante abundante y más accesible que la médula ósea y es el más usado en terapia celular veterinaria (Arzi et al., 2015). Las terapias celulares para animales usando células derivadas de tejido adiposo se han utilizado para tratamiento de osteoartritis, lesiones de ligamentos y tendones en caninos y equinos, gingivoestomatitis felina con buenos resultados y otras patologías que se encuentran en estudio como la falla renal crónica en gatos domésticos. La tasa de MSC en la fracción celular nucleada es muy baja y se requiere una buena purificación y expansión en cultivo para obtener una cantidad suficiente que pueda ser usada con fines terapéuticos. El uso de esta fracción celular sin los respectivos pasos de aislamiento y expansión es comúnmente usada en terapéutica pero no corresponde a una verdadera terapia con células madre. Por su parte, el tejido graso en comparación a la médula ósea tiene un desempeño similar en cultivo y expresa marcadores de superficie similares y su potencial de diferenciación también lo es (De Ugarte et al., 2003). Otros estudios han demostrado que la tasa de proliferación de las MSCs derivadas de tejido adiposo es mucho mayor que las MSCs derivadas de médula ósea (De Ugarte et al., 2003). Adicionalmente, Dahlgren reportó que la frecuencia de células madre encontradas en tejido graso comparado con médula ósea era de 2% vs 0,002% respectivamente, con un promedio de 450.000 células por gramo de grasa, además de concordar con los autores anteriores en su alta tasa proliferativa (Dahlgren, 2009).

Se ha reportado que el potencial de diferenciación de las MSC desde diferentes recursos in vivo e in vitro presenta también diferencias. En el caso de los roedores, las MSC derivadas de tejido adiposo parecen tener un menor potencial de diferenciación condrogénico, probablemente por la expresión reducida de proteínas morfogénicas de hueso como BMP2, BMP4 y BMP6, además de la pérdida de receptores para TGF- $\beta$  que también se ha descrito en tejido adiposo humano (Vidal et al., 2008). En tejido adiposo de caninos también se ha reportado la misma situación respecto al bajo potencial de diferenciación condrogénico en comparación a las MSC de médula ósea de la misma especie, mientras que el potencial de diferenciación osteogénico parece ser similar (Reich et al., 2009). En felinos, Mumaw y colaboradores determinaron que las MSC de tejido adiposo y médula ósea tenían potencial de diferenciación adipogénico, osteogénico y condrogénico, sin embargo parece ser que existe un mejor desempeño en la diferenciación dependiendo del tejido fuente de las MSC (Mumaw et al., 2015). Por esta razón se espera que el potencial de

diferenciación adipogénico en MSC derivadas de tejido adiposo sea mayor que en células derivadas de otros tejidos (Yoshimura et al., 2007).

**Tabla 3.** Expresión de marcadores de superficie de MSC derivadas de tejido adiposo en algunas especies. (Pos: Positivos, Neg: Negativos, ND: No hay datos).

MARCADOR DE SUPERFICIE	ESPECIES				Referencias
	Humana	Equina	Canina	Felina	
CD13	Pos	Neg	ND	ND	Kou et al., 2014,
CD14	Neg	ND	ND	Neg	Choudhery et al., 2014, Kono et al., 2014
CD29	Pos	ND	Pos	ND	Kou et al., 2014, Takemitsu et al., 2012
CD31	Neg	ND	ND	ND	Kou et al., 2014
CD34	Neg	Neg	Neg	Neg	Kou et al., 2014, Barberini et al., 2014, Mumaw et al., 2015, Gómez et al., 2015, Takemitsu et al., 2012
CD44	Pos	Pos	Pos	Pos	Kou et al., 2014, Barberini et al., 2014, Mumaw et al., 2015, Gómez et al., 2015, Takemitsu et al., 2012
CD45	Neg	Neg	Neg	Neg	Mumaw et al., 2015, Gómez et al., 2015, Choudhery et al., 2014
CD73	Neg	ND	ND	Pos/Neg	Choudhery et al., 2014
CD90	Pos	Pos	Pos	Pos	Choudhery et al., 2014, Barberini et al., 2014, Mumaw et al., 2015, Takemitsu et al., 2012
CD105	Pos	Pos	ND	Pos	Kou et al., 2014, Barberini et al., 2014, Mumaw et al., 2015
CD106	Neg	ND	ND	ND	Kou et al., 2014, Mumaw et al., 2015
Alfa-SMA	Neg	ND	ND	ND	Kou et al., 2014, Mumaw et al., 2015
MHC II	Neg	Neg	ND	Neg	Barberini et al., 2014, Gómez et al., 2015

Fuente: Takemitsu et al., 2012; Iacono et al., 2012; Kono et al., 2014; Arzi et al., 2015; Gómez et al., 2015 y Mumaw et al., 2015.

#### 4.1.6 Membrana sinovial

La membrana sinovial fue utilizada para aislamiento de MSCs por primera vez por Bari y colaboradores (De Bari et al., 2001), con gran habilidad para proliferar y potencial de diferenciación condrogénico y adipogénico. Las MSC obtenidas de este tejido presentan una capacidad inferior de diferenciación osteogénica que las MSC derivadas de médula ósea (Fan et al., 2009; Sakaguchi et al., 2005). Por otro lado, las MSC derivadas del sinovio tienen una buena diferenciación condrogénica comparadas con otras fuentes celulares. Esto se debe tal vez a que presentan una alta expresión de receptores para hialuronano. El sinovio y el cartílago se originan desde un recurso común de células progenitoras y el tejido sinovial expresa una variedad de marcadores específicos para cartílago, lo que supone un interesante hallazgo en particular para el tratamiento de lesiones de tendones (Fan et al., 2009). Las complicaciones que supone el aislamiento de las MSCs del tejido sinovial son la anestesia general, el proceso de recuperación

posterior a la toma de muestra, el costo del procedimiento, riesgo de infección entre otras complicaciones para los pacientes, especialmente grandes animales por lo no es un tejido muy utilizado en medicina veterinaria para el aislamiento de MSCs (Fan et al., 2009).

#### 4.1.7 *Ligamento periodontal*

El ligamento periodontal ha sido utilizado en ortopedia equina y las MSC derivadas de este tejido presentan buenos resultados en tratamientos de tendinitis del flexor digital superficial aunque se reporta que los tendones recuperados tienen propiedades biomecánicas inferiores si se compara con tendones sanos (Staszuk et al., 2009). El ligamento periodontal está situado entre el diente y el hueso de la mandíbula y es parte del complejo que mantiene el diente en la cavidad alveolar. En medicina veterinaria se ha explorado este tejido como fuente de MSC en roedores y equinos. En esta última especie presenta un índice de proliferación entre el 1-3% (Warhonowicz et al., 2006). Las células periodontales también mostraron capacidades altamente significativas de auto regeneración debido al número alto de formación de colonias fibroblastoides y doblaje de la población celular, además de la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica. Los marcadores relacionados con la diferenciación condrogénica son altamente expresados a nivel de ARNm (Aggrecan, colágeno tipo II, COMP) (Staszuk et al., 2009). La desventaja de este tejido es el bajo número de células progenitoras, lo que genera cuestionamientos sobre su rol como recurso de MSC para medicina regenerativa (Gould, 1983).

En humanos, este recurso de MSC es ampliamente usado, y además del ligamento periodontal, de la cavidad oral se han aislado y caracterizado alrededor de 8 poblaciones de MSCs: células madre de pulpa dental posnatal (DPSCs), exfoliado de dientes deciduos humanos (SHED), células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), células progenitoras del folículo dental (DFPCs), MSCs derivadas de hueso alveolar (ABMSCs), células madre de la papila apical (SCAP), células progenitoras del diente germinal (TGPCs) y MSCs de gingiva (GMSCs) (Ledesma-Martínez et al., 2016). Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares, de inmunomodular, regenerar y/o reparar muchos tipos de tejido. En el caso de MSC derivadas de tejidos de la cavidad oral, muchos antígenos de superficie han sido identificados como son: Stro-1+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD146+, CD166+, CD271+, CD34+, CD117+, OCT-3/4, NANOG, entre otros. Sin embargo, la expresión de estos marcadores varía entre los 8 tipos de células que pueden ser aisladas de la cavidad oral y no tienen la misma capacidad de diferenciación y regeneración (Ledesma-Martínez et al., 2016; Tatullo, Marrelli, y Paduano, 2015).

#### 4.1.8 *Piel*

Las MSC derivadas de piel son fácilmente accesibles en la mayoría de especies y tiene un bajo costo y bajo riesgo para el paciente. En ratones juveniles y adultos se demostró que las MSC podían ser aisladas de la dermis. Estas células parecen tener la capacidad de diferenciarse en

linajes mesenquimales y neuroectodérmico, incluyendo neuronas, células de la glia, músculo liso y adipocitos. Esto indica que las células madre derivadas de la dermis de roedores son diferentes a las MSCs. Estas células pueden ser pasadas por lo menos durante un año sin perder su capacidad de diferenciación, por lo tanto es probable que representen un nuevo tipo de células madre adultas multipotentes ya que también difieren de las células madre derivadas de la médula ósea ya que requieren diferentes factores de crecimiento para proliferar y por su capacidad selectiva para expresar proteínas típicas de precursores neuronales, así como su morfología (Toma et al., 2001).

#### 4.1.9 *Tejido endometrial*

Las MSC también pueden ser aisladas de tejido endometrial de ratas, mujeres, cerdas, vacas y yeguas (Cabezas et al., 2014; Cervelló et al., 2007; Gargett y Masuda, 2010; Miernik y Karasinski, 2012; Musina et al., 2008; Cabezas et al., 2018). Pueden ser mantenidas en cultivo mientras mantienen un fenotipo indiferenciado y tienen la capacidad de diferenciarse tanto in vivo como in vitro en linajes mesodérmicos bajo inducción (Cabezas et al., 2014) Se ha demostrado que las MSC obtenidas de endometrio o sangre menstrual de mujeres tienen capacidad de diferenciación in vitro en linaje mesodérmico y han sido usadas en humanos para el tratamiento de enfermedades cardíacas (Bockeria et al., 2013) . Adicionalmente estas células han sido inducidas a diferenciación funcional en células tipo hepatocitos con secreción de albúmina, almacenamiento de glicógeno y expresión de citocromo P450 (Khanjani et al., 2015). En humanos, las MSC endometriales son positivas para marcadores CD14, CD34, CD45 y STRO-1, además de expresar OCT4 y ser expandidas clonalmente hasta el pasaje 10 in vitro (Chan y Gargett, 2004; Meng et al., 2007). Donofrio y colaboradores reportaron por primera vez el aislamiento de células progenitoras estromales del endometrio uterino de vacas, las cuales presentaron la capacidad de diferenciarse en linaje osteogénico in vitro y mostraron propiedades similares a las MSC derivadas de médula ósea (Donofrio et al., 2008).

#### 4.1.10 *Otras fuentes potenciales de MSCs*

El cerebro, músculo, fluido sinovial, tendón, placenta y tonsilas son otras fuentes potenciales para la obtención de MSC (Durgam et al., 2009; Jiang et al., 2002; Stewart et al., 2009, Choi et al., 2015). Aunque existen modelos en roedores para estos tejidos, la posibilidad de usar estas células en medicina regenerativa aún es dudosa y falta información sobre la potencialidad de estos tejidos como nichos de MSCs, adicionalmente su capacidad de diferenciación es reducida (Koga et al., 2008). Sin embargo, muestran un buen potencial de calcificación después de la inducción a la diferenciación osteogénica y una buena diferenciación a adipocitos (da Silva et al., 2006; Yoshimura et al., 2007b). Koga y colaboradores demostraron que las MSCs derivadas de músculo tienen un alto potencial proliferativo que otras células madre (Koga et al., 2008). Aunque el aislamiento de MSCs desde tejido cerebral es una práctica realmente poco viable para ser usada

en terapia celular, es importante saber que se pueden aislar para otros propósitos como ingeniería de tejidos. Estas células han demostrado hasta el momento baja proliferación y son menos eficientes en la diferenciación adipogénica (da Silva Meirelles et al., 2006). Por otro lado las MSCs aisladas de la capa del periostio tienen un alto potencial de proliferación condrogénico lo que resulta en una mayor producción de matriz cartilaginosa. En cuanto a la capacidad de calcificación, no es sorprendente que las MSCs derivadas del periostio tengan un alto potencial de proliferación osteogénico (Yoshimura et al., 2007a)

Las tonsilas palatinas son fácilmente accesibles y se puede obtener tejido por tonsilectomía o por biopsia por punción. Recientes estudios han reportado el aislamiento de MSCs desde el tejido tonsilar y encontraron que la morfología, marcadores de superficie celular, potencial de proliferación y de diferenciación eran similares a las MSC derivadas de médula ósea (Choi et al., 2015; Ryu et al., 2012).

## **5. Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSCs)**

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) son generadas por la inducción de la expresión de factores de transcripción de genes de pluripotencia en células que de manera normal no los expresan. De esta forma se puede obtener una célula madre a partir de una célula somática ya diferenciada. Los primeros en desarrollar e implementar esta técnica fueron Takahashi y Yamanaka en el año 2006, quienes lograron inducir fibroblastos embrionarios de ratón a iPSC transfecando la célula con los factores de transcripción "OSKM" que corresponden a factor de transcripción de unión a octámero 3/4 (Oct3/4), grupo de proteínas de alta movilidad relacionadas con el gen SRY2 (Sox2), factor 4 de Kruppel (Klf4) y oncoproteína c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Un año más tarde describen la generación de iPSCs humanas desde fibroblastos de piel con los mismos 4 factores "OSKM". Ellos demostraron que estas células eran similares las ESCs humanas en términos de morfología, proliferación, antígenos de superficie, expresión de genes y estatus epigenético de genes específicos de pluripotencia celular, actividad de la telomerasa y la capacidad de diferenciarse en células de las 3 capas germinativas (Takahashi et al., 2007).

Estos factores de transcripción fueron introducidos en las células somáticas a través de vectores virales (retrovirus o lentivirus inicialmente), sin embargo existen hasta la fecha varias metodologías para inducir la pluripotencia, como los plásmidos episomales, vectores Piggybac, moléculas inhibitorias, RNAm, microRNAs, proteínas purificadas, CRISP/Cas9, entre otros.

La obtención de células madre pluripotentes inducidas es el blanco de muchos estudios en diversas especies. Hasta el momento se han reportado iPSC de ratones, ratas, cerdos, humanos, primates no humanos, perros, bovinos, ovinos, equinos, caprinos, rinoceronte y leopardo de las nieves (Cebrian-Serrano et al., 2013). Se considera una reprogramación exitosa cuando la célula inducida expresa genes endógenos de pluripotencia a través de los continuos pasajes. Este tipo de célula se describe como "naïve" y es el principal objetivo de toda técnica de reprogramación (Nichols y Smith, 2009). Hasta la fecha se han reportado ESC e iPSC derivadas de ratones y ratas



con estado “naïve” de pluripotencia, que expresan los marcadores Rex1 y Nr0b1, los dos cromosomas femeninos activos y la habilidad para generar una descendencia de una línea germinal quimérica competente. Algunas publicaciones reportan en porcinos células iPSC de tipo “naïve” argumentando su capacidad para generar quimeras a través de la inyección de iPSC en mórula. La fluorescencia de las células iPSC se siguió durante el desarrollo a blastocisto y posteriormente se implataron en un hembra para evaluar la expresión de quimeras positivas a fluorescencia, las cuales fueron disminuyendo hasta el día 65 de gestación dónde no se pudo continuar identificando la fluorescencia (Fujishiro et al., 2012).

Las iPSC han sido obtenidas de un amplio rango de domésticos ungulados, felinos salvajes, caninos y primates no humanos. También se ha reportado la obtención de iPSCs de especies al borde de la extinción como son el rinoceronte blanco y el dril (Ben-Nun et al., 2011).

Respecto a otras especies domésticas, como el gato, no hay claridad sobre la obtención de iPSC ya que los reportes científicos hablan de gatos en general, más su respaldo bibliográfico hace referencia a grandes felinos (Ezashi et al., 2016). Una de las grandes limitaciones que presentaban las células ESC-like era demostrar la formación de teratomas, a pesar de esto la tecnología de la reprogramación ha demostrado que es posible obtenerlos. Sin embargo, no en todas las especies se ha podido demostrar la generación de quimeras y su transmisión a su descendencia a excepción de los murinos, ovinos y porcinos (Li et al., 2010; Sartori et al., 2012; West et al., 2011).

### *5.1 Células madre pluripotentes inducidas de felinos*

Hasta la fecha se encuentran reportes de iPSC generadas de especies felinas amenazadas o en peligro de extinción como son el leopardo de las nieves, el tigre, jaguar y serval africano. Verma y colaboradores han evaluado algunos protocolos para la inducción a la pluripotencia, concluyendo que Nanog es un factor clave en la reprogramación (Verma et al., 2013). En general los cocteles de reprogramación de Verma y colaboradores incluyen los 4 factores de Yamanaka, más Nanog y emplean medio de cultivo suplementado con LIF y SFB. Verma et al, (2013) habían evaluado el coctel de reprogramación sin Nanog en sus primeros experimentos pero la eficiencia de reprogramación se vio muy reducida y las colonias alcanzaban sólo hasta el séptimo pase (P7). Por su parte, la inclusión de Nanog consiguió que las colonias iPSCs se pudieran expandir in vitro, fueron positivas para fosfatasa alcalina y expresión de proteínas de OCT-4, NANOG y SSEA-2 al pase 14 (P14). Oct4 y Nanog endógenos fueron detectados por RT-PCR al pase 4 y 14, indicando reprogramación y reactivación de genes de pluripotencia endógenos.

## **6. Células Madre Mesenquimales inducidas (iMSC)**

Las iMSC son un concepto relativamente reciente, que hace referencia al nivel de plasticidad celular de algunas células terminalmente diferenciadas para modificar su nivel de potencia. La medicina regenerativa tiene como objetivo contribuir a la reparación o reconstrucción del tejido

lesionado o degenerado. La terapia celular con células madre mesenquimales ha sido la más empleada para este objetivo sin que se presente riesgo de rechazo o formación de tumores. Sin embargo, para la mayoría de tejidos que requieren regeneración, su cultivo y expansión de células madre es un completo desafío.

El primer indicio de la inducción de células somáticas a células madre mesenquimales fue obtenido con el uso de exosomas de células madre mesenquimales derivadas de placenta en el medio de cultivo de fibroblastos (Tooi et al., 2016). Estos exosomas lograron incrementar la expresión de genes relacionados con multipotencia en fibroblastos e influenciar la capacidad de diferenciación de las células hacia linaje osteogénico y adipogénico. Anteriormente se había reportado la capacidad de los exosomas para influenciar epigenéticamente las células diana y en fibroblastos dérmicos humanos se logró incrementar la expresión de OCT4 y NANOG. En los estudios de Tooi y colaboradores concluyen que sólo con una sutil inducción de la expresión de OCT4 es suficiente para alterar la competencia de diferenciación de los fibroblastos (Tooi et al., 2016).

Posteriormente Chandrakantan y colaboradores lograron inducir células somáticas completamente diferenciadas (osteoclastos y adipocitos) de ratón hacia células mesenquimales multipotentes mediante la inducción con AZA (5-Azacitidina) y PDGF-AB (Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB). El AZA se incorpora al ADN y ARN, y el PDGF-AB es un factor mitógeno y de supervivencia celular. Las iMSCs obtenidas por medio de estas moléculas de reprogramación no mostraron signos de desarrollar malignidad por lo menos durante las 12 semanas subsiguientes. Estas células, iMSCs, presentaron características similares a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, aumentando la expresión de OCT4 y NANOG y en el análisis de metilación del promotor de OCT4, las células tratadas presentaban un mejor porcentaje de metilación (Chandrakanthan et al., 2016). Estas células madre mesenquimales inducidas también presentaron capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos (adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis) y fueron positivas para la expresión de marcadores de superficie CD90, CD105 y CD166 (Chandrakanthan et al., 2016).

Las células madre mesenquimales inducidas han sido obtenidas también a partir de fibroblastos dérmicos de humanos con el uso de un coctel definido de pequeñas moléculas y factores de crecimiento con un porcentaje de éxito del 38% (Lai et al., 2017). Las células fueron cultivadas durante 6 días en un medio que contenía las moléculas reprogramadoras SP600125, SB202190, Go6983, Y-27632, PD0325901, CHIR99021) y con o sin los siguientes factores de crecimiento: TGF- $\beta$ , bFGF y LIF. Los fibroblastos humanos fueron convertidos directamente a MSC y lograron diferenciarse posteriormente a linajes mesodérmicos y formaron colonias fibroblastoides similar a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Lai et al., 2017).

Lai y colaboradores encontraron expresión basal de OCT4 en fibroblastos dérmicos humanos y lograron incrementar su expresión a niveles similares a los que expresan las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Lai et al., 2017).



Las iMSC comparten un número de características in vitro con MSC derivadas de tejido. No obstante, las iMSC son transcripcionalmente distintas y tienen mayores ventajas sobre las MSC, incluyendo su plasticidad celular, retención en los sitios de administración y la contribución a la regeneración de los tejidos (Chandrankanthan et al., 2016).

## **7. Reprogramación celular a partir de moléculas reprogramadoras**

La reprogramación es posible también con el uso de proteínas recombinantes que pueden modificar el genoma blanco y reemplazar algunos factores de transcripción reduciendo la retención de la memoria epigenética (Nie et al., 2012; Zhao, 2008). Huangfu y colaboradores estudiaron la aplicación de algunos componentes en la generación de iPSCs, evaluando los efectos que tenía el ácido valproico como inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y encontraron que la eficiencia de reprogramación había incrementado en 100 veces más que los métodos que usan factores de transcripción (Huangfu et al., 2008). Desde entonces las pequeñas moléculas han sido usadas para generar iPSCs en diferentes especies, en la mayoría de los casos en combinación con algunos factores de reprogramación, y cuando se combinan con otros componentes, estas moléculas pueden inducir transdiferenciación en diferentes tipos celulares (Brevini et al., 2016)

Estas moléculas se conocen de acuerdo a su mecanismo de acción como modificadores o remodeladores epigenéticos, integradores en sitios moduladores de señal de factores de crecimiento (WNT) o moderadores de senescencia celular del metabolismo. (Chin et al., 2009; Li et al., 2009; Nie et al., 2012) (Ver tabla 4).

Los modificadores epigenéticos intervienen en los procesos de metilación y acetilación del ADN, siendo la metilación la adición covalente de un grupo metilo al carbono en la posición 5 del anillo de citosina del ADN; la metilación actúa inhibiendo la iniciación de la transcripción bloqueando directamente el factor de unión al promotor y también indirectamente por promover la desacetilación de histonas, resultando en una condensación de la cromatina (Jones and Takai, 2001) . Los genes hipermetilados no se expresan y en contraste, los genes que se expresan no presentan metilación de sus promotores y usualmente exhiben acetilación de la lisina de las histonas y metilación de H3K4, H3K36 y H3K79. El inhibidor de la ADN metiltransferasa, 5-Azacitidina (5-AZA) y el inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), ácido valproico (VPA), han mostrado ser capaces de incrementar la eficiencia de reprogramación e incluso reducir el número de factores requeridos para reprogramación (Mikkelsen, 2008). La 5-AZA es un químico derivado de la ADN nucleósido citidina, el cual requiere ser incorporado al ADN para inhibición de la ADN metiltransferasa-1 para inducir demetilación y reactivación de genes silentes. 5-AZA ha mostrado facilitar la transición para una pluripotencia completa o una línea celular parcialmente reprogramada y para promover el número de colonias de células madre tipo embrionarias generadas desde fibroblastos (Huangfu et al., 2008). Por otra parte, las enzimas HDACs remueven grupos acetilo desde las lisinas de las proteínas histonas y otras proteínas regulatorias y estructurales que juegan un rol crítico en remodelación de la cromatina. Los inhibidores HDAC median la reprogramación a través de varios

procesos, como histona desacetilación, factor de transcripción o regulador de acetilación seguido por remodelador de cromatina. Aunque solo un pequeño número de genes que codifican para proteínas son afectados por la acción de inhibidores de HDAC, casi la mitad de los microRNAs no codificantes son sobrerregulados o regulados a la baja. El VPA es el inhibidor HDAC más ampliamente usado para habilitar y mejorar la eficiencia de la reprogramación promoviendo la activación de genes de pluripotencia (Biswas and Jiang, 2016).

Otras moléculas actúan como antioxidantes, la más empleada es la vitamina C, que promueve la formación de iPSCs en humanos y ratones por disminución indirecta de la expresión de p53 y p21 (Esteban et al., 2010). Adicionalmente, la vitamina C actúa como cofactor en reacciones manejadas por dioxigenasas incluidas las prolin-hidrogenasas de colágeno (un factor inductor de hipoxia) e histonas demetilasas, considerando que la vitamina C puede tener influencia en la reprogramación al incrementar la actividad de estas enzimas (Shi, 2007). Las histonas demetilasas son importantes para modular la expresión del factor de transcripción Nanog (Cloos, Christensen, Agger, y Helin, 2008). Es probable por lo tanto, que la vitamina C permita una reprogramación más eficiente facilitando la demetilación de las histonas (Feng et al., 2009).

Los factores de crecimiento también son empleados como soporte para la reprogramación celular, como es el caso del factor de crecimiento fibroblastoide 2 (FGF-2) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) empleados para promover la reprogramación directa de fibroblastos a células cardíacas y la combinación de factor de crecimiento epidermal (EGF) Y FGF-2 para la inducción de células neuronales (Ring et al., 2012; Yamakawa et al., 2015). Los factores de crecimiento derivados de plaquetas también han sido empleados para soportar eventos de reprogramación favoreciendo funciones como proliferación celular, supervivencia y motilidad de ciertos tipos celulares (Heldin, 2013). Los factores de crecimiento actúan a través de receptores de tipo tirosin-kinasa activando principalmente la vía de señalización MEK/MAPK para favorecer la expresión de los genes relacionados con pluripotencia y autorenovación (Heldin, 2013).

**Tabla 4.** Pequeñas moléculas empleadas en reprogramación de células somáticas.

<i>Blanco o vía de señalización</i>	<i>Nombre</i>	<i>Concentración</i>	<i>Especie</i>	<i>Eficiencia y necesidad</i>	<i>Referencia</i>
Inhibidor HDAC	VPA	0.5–2mM	Humano, ratón, bovino, porcino	>100-veces	Huangfu et al. 2008; Heo et al. 2015; Cheng et al. 2012
Inhibidor HDAC	SAHA	5 $\mu$ M	Ratón	10-veces	Huangfu et al. 2008
Inhibidor HDAC	TSA	20nM	Ratón	10-veces	Huangfu et al. 2008
Inhibidor HDAC	Butirato de sodio	0.5–1mM	Humano, ratón	100-veces	Mali et al. 2010
Inhibidor DMNT	5-aza-CR, AZA	0.5mM	Ratón	3-veces	Mikkelsen et al. 2008
Inhibidor DMNT e histona deacetilasa	RSC133	10 $\mu$ M	Humano	3-veces	Lee et al. 2012
Agonista del receptor del ácido retinóico	AM580	100nM	Ratón	~ 200-veces	Wang et al. 2011
Inhibidor de demetilación de H3K4 (modulador epigenético)	Tranilcipromina (Parnato)	5–10 $\mu$ M	Ratón	3-veces	Li et al. 2009
Moduladores epigenéticos	DZNep	0.05–0.1 $\mu$ M	Ratón	65-veces	Hou et al. 2013
Ligando del receptor del ácido retinóico	TTNPB	1 $\mu$ M	Ratón	15-veces	Hou et al. 2013
Inhibidores ALK4, ALK5, y ALK7	SB431542	10uM	Humano, equino, porcino	Thiazovivin y PD0325901, ~200 veces (humano)	Lin et al. 2009; Withworth et al. 2014; Liu et al. 2012; Zhang et al. 2014; Gu et al. 2014
Inhibidor selectivo de MEK/ERK	PD0325901	1 uM	Humano, porcino	Thiazovivin y SB431542, ~200-veces (humano)	Lin et al. 2009; Telegu et al. 2010; Telegu et al. 2011; Zhang et al. 2014; Rodríguez et al. 2012; Gu et al. 2014
Inhibidor Rho-asociado a proteína quinasa	Thiazovivin	1uM	Humano, equino	PD0325901 y SB431542, ~200-veces (humano)	Lin et al. 2009; Nagy et al. 2011
Inhibidor Rho-asociado a proteína quinasa	Y27632	10uM	Humano	Mejoró la generación y mantenimiento	Claassen et al. 2009
Inhibidor mediado por Akt de GSK3- $\beta$	Compound B6	1 $\mu$ M	Ratón	3-veces	Li et al. 2009
Inhibidor GSK-3 $\beta$ , inhibidorLSD1	Lic1	5–10mM	Humano, ratón	>10-veces	Wang et al. 2011
Inhibidor de TGF- $\beta$	A83-01	0.5 $\mu$ M	Humano, ratón, equinos, caninos	7-veces (humano)	Zhu et al. 2010, Nagy et al. 2011; Withworth et al. 2014; Shimada et al. 2010; Withworth et al. 2012
Inhibidor Prolif-4-hidroxilasa	N-Oxalilglicina	1 $\mu$ M	Humano	No hay dato	Zhu et al. 2010
ALK4 inhibitor	Componente B4 (TGF $\beta$ -RI)	1 $\mu$ M	Ratón	4-veces	Li y Rana 2012
mTOR inhibitor	Rapamicina	0.3nM	Ratón	4,8-veces	Chen et al. 2011
IP3K inhibitor	Componente B8	1-2 $\mu$ M	Ratón	3-veces	Li et al. 2009
P38 kinase inhibitor	Componente B10	1-2 $\mu$ M	Ratón	3-veces	Li y Rana 2012
cAMP agonist	Prostaglandina E2	5 $\mu$ M	Ratón	Eficiente en mezcla	Hou et al. 2013
cAMP agonist	Rolipram	10 $\mu$ M	Ratón	Eficiente en mezcla	Hou et al. 2013
Activador de cAMP-dependiente de proteína quinasa	8-Br-cAMP	0.1–0.5mM	Humano	6,5-veces	Wang et al. 2011
PDK1 activator	Ácido enoico 5-(4-Cloro-fenil)- 3-fenil-penta-2 (PS48)	5 $\mu$ M	Humano	15-veces	Zhu et al. 2010
HIF PHD1 and PHD2 inhibitor	N-Oxalilglicina Fructosa	1 uM	Humano	3,5-veces	Zhu et al. 2010
Phosphofruktokinase 1 activator	2,6-bisfosfato	10mM	Humano	2-veces	Zhu et al. 2010
Hypoxia-inducible factor pathway activator	Quercetin	1 $\mu$ m	Humano	3-veces	Zhu et al. 2010
Oxidative phosphorylation uncoupler	DNP	1 $\mu$ M	Humano	2-veces	Zhu et al. 2010

Fuente: Modificado de Lin y Wu 2015.

Por otra parte, la MET es un proceso biológico reversible que involucra la transición desde una célula mesenquimal con morfología fibroblastoide, multipolar hacia matrices planas de células epiteliales polarizadas. La reprogramación inevitablemente involucra la MET, con células en varias etapas de reprogramación, como se mencionará más adelante, que sufren cambios morfológicos hacia una célula de tipo epitelial. Algunos investigadores han demostrado que la inhibición de la vía de señalización TGF- $\beta$  facilita la reprogramación a través de la represión del fenotipo mesenquimal induciendo la MET e induciendo la sobre expresión de E-Cadherina (Li et al. 2010). Li y colaboradores utilizaron la combinación de dos pequeñas moléculas, SB431542 (inhibidor del receptor TGF- $\beta$ ) y PD0325901 (un inhibidor de la MEK), demostrando que la eficiencia de reprogramación de células humanas mejoró 100 veces (Lin et al., 2009). El inhibidor del receptor de TGF- $\beta$  (A-8301), combinado con el inhibidor de la proteína arginine-metiltransferasa (AMI-5), junto con Oct4, han demostrado promover también la reprogramación (Yuan et al., 2011).

KLF4 y C-MYC también pueden ser reemplazadas por pequeñas moléculas. Huangfu y colaboradores reprogramaron MEFs en iPSCs usando VPA más tres factores de transducción, en este caso VPA pudo reemplazar al oncogén C-MYC (Huangfu et al., 2008). Li y colaboradores tuvieron éxito al generar iPSCs de ratón al usar como factor de transducción sólo a OCT4 y adicionando VPA, CHIR99021, 616452 y tranilcipromina (VC6T) en el medio de cultivo (Li et al., 2011).

Se cree que la combinación de pequeñas moléculas facilita la generación de iPSC mediante la reducción de barreras en el proceso de reprogramación. Es por esto que el primer protocolo en el que se usaron únicamente componentes químicos para la reprogramación se basó en estos protocolos, así como muchas otras combinaciones han sido reportadas (Hou et al., 2013; Yu et al., 2014). La combinación de CHIR99021 y PD0325901 conocida como 2i ha demostrado mantener la pluripotencia de ESC de ratón (Ying et al., 2008). Hou y colaboradores cultivaron las células parcialmente reprogramadas en medio 2i con LIF, el cual induce una sobrerregulación estable de OCT4 y NANOG, silenciamiento de transgenes y competencia de quimerismo de la línea germinal y somática, obteniendo una reprogramación completa a iPSC de ratón (Hou et al., 2013).

## **8. Fases de la reprogramación de células somáticas**

### *8.1 Fase temprana o de iniciación*

Brambrink y colaboradores (2008) encontraron que se generaba una regulación a la baja en la expresión de marcadores de superficie específicos para los fibroblastos y aumentaba la expresión de genes asociados a la pluripotencia. Adicionalmente documentaron que la actividad de la telomerasa aumentaba en estas células sometidas a reprogramación (Brambrink et al., 2008). En esta primera fase también se pueden evidenciar algunos cambios morfológicos debido a que se inicia una transición mesenquimal a epitelial (MET) en la célula. Este evento a nivel molecular se caracteriza por pérdida de factores de transcripción Snail/2 o Zeb1/2 y aumento de la expresión de Cdh1, Epcam y la familia miRNA-200 (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). La importancia de estos

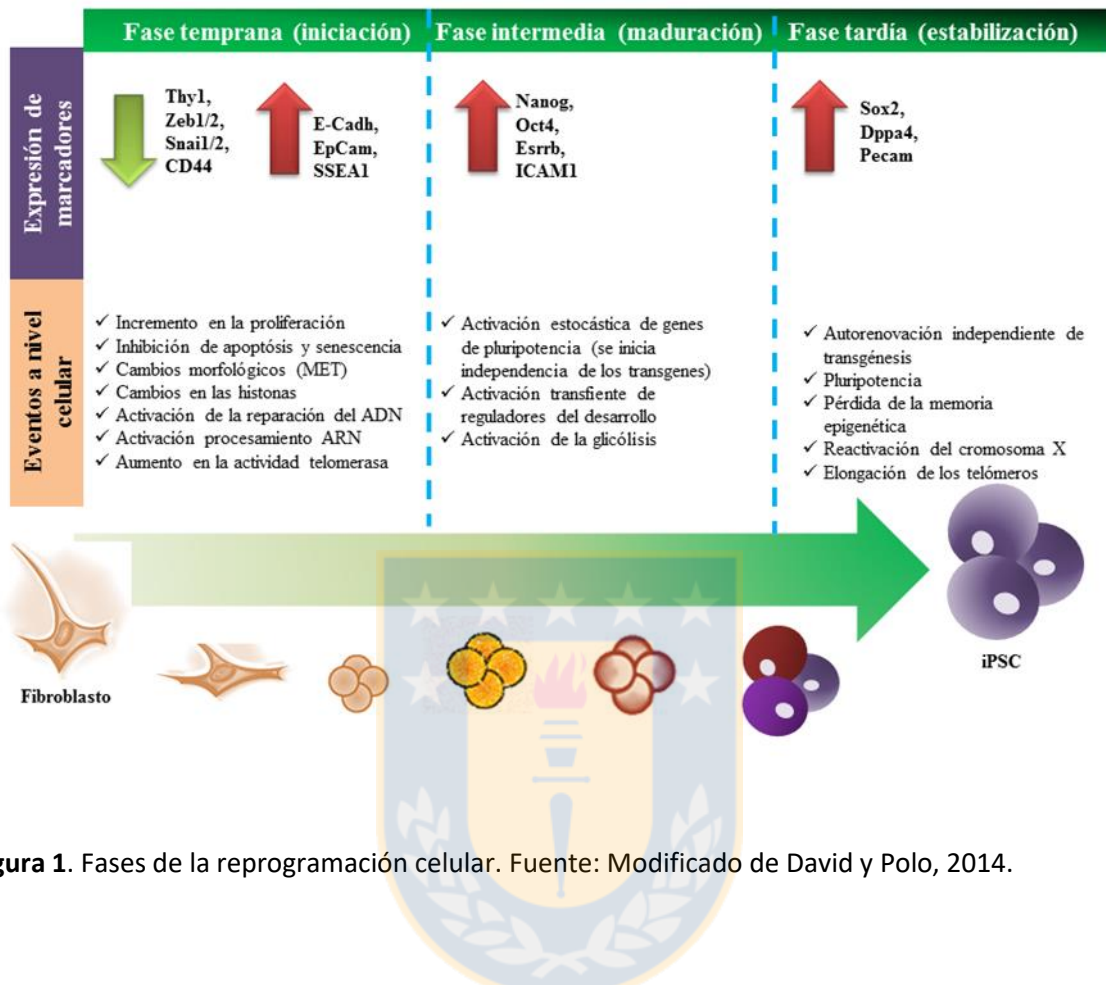
cambios celulares se destaca además porque la morfología de la célula puede desencadenar modificaciones epigenéticas que regulan la reprogramación, lo cual está mediado por el reordenamiento del citoesqueleto mediado por kinasas (Downing et al., 2013; Sakurai et al., 2014). Las células adquieren también una resistencia a la apoptosis y senescencia que se demuestra por la activación de las cascadas de señalización que median estos eventos (Hong et al., 2009). Esta fase se puede monitorear por la medición en la expresión de marcadores, como Thy1 y CD44 que se encontrarían regulados a la baja, y SSEA1 o fosfatasa alcalina que aumentan a medida que avanza esta etapa (O'Malley et al., 2013). Esta primera onda o fase temprana finaliza cuando los genes asociados a la pluripotencia como Nanog y Oct4 comienzan a expresarse (Araki et al., 2010; Megyola et al., 2013). En resumen, se espera que en este periodo incrementalmente la proliferación celular, ocurran cambios metabólicos, se inicie la MET, se den cambios en las histonas, se active la maquinaria de reparación del ADN así como el procesamiento de ARN (David and Polo, 2014) (Figura 1).

### *8.2 Fase intermedia o de maduración*

Durante esta fase, ocurre la segunda onda de mayores cambios a nivel transcripcional y está marcada por el inicio de la expresión de los primeros genes asociados a la pluripotencia (Samavarchi-Tehrani, P., Golipour et al. 2010). Estos genes se van activando gradualmente, los primeros genes endógenos en ser detectados son Fbxo15, Sall4 y Oct4, seguidos por Nanog y Esrrb. Finalizando esta fase es posible detectar Sox2 ó Dppa (David y Polo 2014). Sin embargo, la expresión de estos genes no garantiza la completa reprogramación de la célula somática (Buganim et al., 2013b). Es necesario que ocurra otra secuencia de eventos durante la fase tardía de la reprogramación. Durante la fase final de esta onda se genera una modificación de regiones inactivas del ADN que están asociadas a factores de pluripotencia, evento que se explica por los cambios en la metilación del material genético y que se relaciona con el silenciamiento de los transgenes (David y Polo 2014; Figura 1).

### *8.3 Fase de estabilización*

Se define el inicio de esta fase cuando las células reprogramadas han adquirido su pluripotencia y son capaces de mantener este estado sostenido independientemente de los factores externos que produjeron dicha reprogramación (Ho et al., 2011). Es en esta etapa cuando puede evaluarse la pluripotencia. Tanto en ratones como en humanos, se establece un evento de borrado de la memoria epigenética, lo que evita que la célula iPS retorne a su estado somático inicial, es decir, sufra diferenciación (Kim et al., 2011). Se espera que los cambios en los perfiles de metilación del ADN que se iniciaron en la fase de maduración, se sostengan durante esta fase y que se reactiven los reguladores de metilación del ADN como AID, familia TET, y DNMTs (Polo et al., 2012). (Figura 1).



**Figura 1.** Fases de la reprogramación celular. Fuente: Modificado de David y Polo, 2014.

### 9. Mecanismos que pueden determinar la eficiencia de la reprogramación de células somáticas

Los mecanismos que de forma directa o indirecta determinan la eficiencia de la reprogramación son muy variables. Sin embargo, existen algunos que pueden ser relevantes y se mencionan a continuación:

1. Estado de diferenciación al inicio de la reprogramación. Existen algunos reportes de que las células progenitoras y las células madre tienen mayor eficiencia de reprogramación que células completamente diferenciadas (Eminli et al., 2009; Zhang et al., 2014). Sin embargo, los fibroblastos dérmicos se han reprogramado exitosamente en muchas especies (Ezashi et al., 2016).
2. Existe una variación en la eficiencia para diferentes tipos de células somáticas del mismo donante. Yan y colaboradores por ejemplo, reportan una mayor eficiencia en la generación de iPSC utilizando 3 tipos de células madre progenitoras dentales humanas (de la decidua, papila apical y pulpa dental) comparadas con los fibroblastos, por lo que las consideran un excelente recurso para generar iPSC con fines terapéuticos (Trokovic et al., 2015; Yan et al., 2010). Streckfuss-Bohme y



colaboradores reportan también en humanos mejores resultados de reprogramación de las MSC comparadas con fibroblastos y keratinocitos (Streckfuss-Bomeke et al., 2013).

3. La senescencia celular afecta la eficiencia de reprogramación y ésta incrementa con la edad del donante ya que hay una mayor participación de las vías de señalización p53/p21 y p16 relacionadas con la apoptosis (Campisi et al., 2007). Se ha reportado que la eficiencia de reprogramación es superior cuando se emplean células de animales jóvenes (Wang et al., 2011).

4. El pasaje celular también es otro factor importante que influye en la eficiencia de la reprogramación. En humanos se ha reportado que hay un mayor porcentaje de eficiencia en la reprogramación cuando los fibroblastos son jóvenes y se encuentran en pasajes tempranos (Trokovic et al. 2015).

5. La eficiencia de reprogramación es muy variable y depende del método utilizado para la inducción, sistema de cultivo in vitro, modelo animal, reactivos y medios de cultivo (Sancho-Martinez et al., 2014).

6. Una espontánea diferenciación de las células puede ocurrir así todo el proceso de cultivo se encuentre bien estandarizado (Sancho-Martínez et al. 2014).

Estos factores hacen que la reprogramación celular sea aún un evento molecularmente complejo que no está completamente entendido, sin embargo, el éxito en la reprogramación celular está claro que depende de la extinción del programa somático y la subsecuente activación de genes de pluripotencia endógenos (Stadtfield y Hochedlinger, 2010), particularmente de Oct4 y Nanog.

La activación del factor de transcripción Nanog durante la reprogramación es imprescindible para la completa maduración a iPSC en humanos, bovinos y felinos (Silva et al., 2009; Sumer et al., 2011; Verma et al., 2013). Se ha demostrado que aunque Nanog no es necesario en el pool inicial de reprogramación en la especie murina (Takahashi y Yamanaka 2006), su inclusión en este pool mejora la eficiencia. Verma y colaboradores encontraron que NANOG era necesario en el coctel de reprogramación para la inducción de fibroblastos a iPSCs en algunos felinos (Verma et al. 2013). En bovinos también se ha demostrado que el coctel de reprogramación debe incluir Nanog ectópico para lograr una exitosa reprogramación (Talluri et al. 2015).

La ausencia de Nanog hace que las células se retengan en el proceso de reprogramación, lo que impide adquirir las cualidades de una célula iPSC madura (Theunissen et al., 2011). Por tanto cualquier efector positivo o negativo de la expresión de Nanog puede incidir en la eficiencia de la reprogramación de células somáticas a iPSCs. Por otro lado se demostró que Nanog puede ser bloqueado por Gata4 y en consecuencia bloquear la reprogramación celular (Serrano et al. 2013).

Oct4 también tiene una participación activa en la adquisición de pluripotencia a partir de las células somáticas. En el caso de la adquisición de multipotencia se ha reportado la importancia de la demetilación del promotor de Oct4 para generar la re-expresión de Oct4. En osteocitos de ratón

inducidos a mesenquimales, la expresión de Oct4 fue determinante para la reexpresión de otros genes de pluripotencia que activaron la plasticidad de estas células reprogramadas. La reactivación de todos estos genes es resultado del borrado epigenético de las células somáticas sin importar que su nivel de expresión sea bajo en comparación con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Chandrakanthan et al., 2016).

Oct4 es un factor importante que contribuye a la multipotencia y también se ha encontrado una mayor expresión de este factor en fibroblastos humanos inducidos a mesenquimales comparable a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, lo que sugiere que su expresión es determinante para alcanzar este estado de potencia celular (Lai et al., 2017; Tsai, Su, Huang, Yew, & Hung, 2012).

## **10. Reprogramación hacia otros tipos celulares y niveles de potencia**

### *10.1 Transdiferenciación*

Los resultados de diversos estudios han generado un debate científico sobre el planteamiento de la irreversibilidad y unidireccionalidad de la biología y desarrollo celular hacia un linaje específico a lo largo de toda la vida del individuo. Las células madre adultas pueden dar origen a células de diferente origen embrionario, se plantea que este evento está mediado por la influencia de factores del microambiente extracelular y se le ha denominado como transdiferenciación (Horwitz, 2002). Este evento implica que una célula de un linaje específico se pueda convertir a una célula de otro linaje distinto al mismo tiempo que se modifica la expresión de sus marcadores de superficie y adquiere funciones celulares del tipo celular al cual se está diferenciando (Horwitz, 2002; Tosh y Slack, 2002; Wagers, 2004). La transdiferenciación puede ocurrir con o sin división celular (Tosh y Slack, 2002). Este proceso implica la reprogramación genética de la célula y se plantea que puede ocurrir a través de múltiples pasos. Se ha propuesto que la conversión celular puede suceder por la activación directa de un programa de diferenciación que altera la especificidad del linaje original o, por la pérdida de la diferenciación celular, es decir, de-diferenciación, en el cual la célula regresa a un estado más primitivo y luego sufre diferenciación hacia otro linaje (Wagers, 2004).

La gastrulación proporciona el primer ejemplo de transdeterminación, donde una invaginación del ectodermo origina el mesodermo. La transdeterminación y transdiferenciación también pueden tener un papel en la regeneración, metaplasia y cáncer (Slack, 2007; Yang y Weinberg, 2008). Por ejemplo, la eliminación del lente del ojo de un tritón conduce a la despigmentación de las células dorsales del iris y su re-diferenciación en células del lente transparente que consisten en queratinocitos especializados (Slack, 2007). En otros estudios de regeneración de miembros en ajolotes se ha asumido que el blastema que se forma es en respuesta a una lesión y contiene células en des y re-diferenciación. Otros trabajos recientes indican que sólo las células de la dermis pueden transdiferenciarse en cartílago y tendones, mientras que el cartílago, el músculo y precursores neuronales dentro del blastema no cambian de identidad antes de la generación de



un nuevo miembro (Kragl et al., 2009). Varios tipos de metaplasia se han atribuido a la transdiferenciación y la transición epitelial a mesenquimal (EMT) puede estar implicada en el desarrollo de cáncer de tipo metastásico (Yang y Weinberg, 2008). Durante la EMT se activa la expresión de factores de transcripción como Snail y Slug (Slack, 2007; Yang and Weinberg, 2008). Existe evidencia de que las células funcionalmente diferenciadas pueden cambiar de destino durante el desarrollo, es así como las células sanguíneas fetales se originan en la aorta dorsal después de la activación de Scl (también conocido como TAL1) y Runx1, dos factores de transcripción esenciales para la formación de células madre hematopoyéticas (Chen et al., 2009; Dzierzak y Speck, 2008; Kragl et al., 2009).

El papel de los factores de transcripción se ha descrito y demostrado desde los años 1980, cuando se descubrió que la expresión forzada de MyoD puede inducir formación de miotúbulos en una línea celular de fibroblastos (Davis et al., 1987). La evidencia de la recíproca regulación de los genes restringidos a linajes proviene del sistema sanguíneo que con su diversidad de linajes bien definidos y progenitores intermedios aislables, permite la experimentación de conversión de linaje. Por lo tanto, cuando se expresa de forma ectópica en las líneas celulares de los monocitos (precursores de macrófagos) a niveles altos, el factor de transcripción eritroide asociado a megacariocitos, GATA1, no sólo induce la expresión de marcadores de linaje eritroide-megacariocitos, sino también regula a la baja marcadores monocíticos (Visvader et al., 1992). Los niveles más bajos de GATA1 inducen la formación de los eosinófilos, de acuerdo con sus niveles en eosinófilos normales. Por otro lado, la expresión de PU.1 (también conocido como Sfp1) en una línea de células eritroides-megacariocíticas induce su conversión en linaje de monocitos al reprimir GATA1 (Nerlov y Graf, 1998).

Se ha demostrado también que incluso las células totalmente diferenciadas se pueden transdiferenciar. C/EBP $\alpha$ , un factor de transcripción requerido para la formación de precursores de granulocitos y macrófagos puede convertir progenitores de células B y T en macrófagos funcionales (Laiosa et al., 2006; Xie et al., 2004).

Otros reportes tienen una aproximación a la transdiferenciación somática utilizando factores de transcripción. A esto se le conoce como transdiferenciación mediada por OSKM o mediada por factores de Yamanaka, la cual consiste en una reprogramación corta de 3 a 10 días en la que se induce un estado intermedio o reprogramación parcial presumiblemente no pluripotente (Gurdon y Melton, 2008; Kulesa et al., 1995; Wilmut et al., 1997). Posteriormente, en un medio específico para el linaje, que carece de citoquinas promotoras de la pluripotencia convencionales, como el factor inhibidor de leucemia (LIF), son adicionados para dirigir ese estado intermedio hacia el estado somático celular deseable sin llegar a ser pluripotente (Gurdon y Melton, 2008; Kulesa et al., 1995; Wilmut et al., 1997). Sin embargo, aunque se observa estabilidad en muestras transdiferenciadas, los análisis de algunos cromosomas de células que fueron transdiferenciadas a neuronas presentaban aberraciones, en las células humanas en el cromosoma 17 y en las murinas en el 11 (Mayshar et al., 2010; Weissbein, Ben-David, y Benvenisty, 2014).

Los mecanismos para que se cumpla la transdiferenciación involucran reorganización celular masiva a niveles transcripcional, pos-transcripcional y biológicos de la célula. Estos mecanismos, que constan de señales extracelulares que dirigen la transdiferenciación deben ser regulados de manera espacio-temporal específico, ya que sin este control, las alteraciones en la identidad celular pueden dejar disrupciones marcadas en la función del tejido. Aunque los factores intra y extracelular que son requeridos por las células para cambiar de identidad han sido identificados en casos específicos, la mayoría de conductores de la plasticidad celular permanecen desconocidos. No obstante, la remodelación de la cromatina es el centro de este proceso de transdiferenciación, por lo menos para los casos de células hepáticas y pancreáticas. Se presume que las vías de señalización para la transdiferenciación están relacionadas con el desarrollo embrionario. Se conoce que la vía de señalización NOTCH regula el desarrollo de las vías biliares por coordinación de diferenciación y morfogénesis (Zong et al., 2009). Por otra parte, en el tejido hepático adulto, la señalización ectópica de NOTCH convierte hepatocitos a células biliares (Yanger et al., 2013). El proceso de la transdiferenciación es dependiente de NOTCH y requiere de la proteína RBPJ para su unión al ADN, cuyo proceso puede tardar de días a semanas, asemejándose a la reprogramación hacia la pluripotencia (Yanger y Stanger, 2014). Controversialmente, las rutas que pueden inducir reprogramación también pueden desencadenar la aparición de carcinomas (Villanueva et al., 2012).

El potencial terapéutico que representa poder explotar la plasticidad celular es la finalidad de la mayoría de estudios. Aún existen pocos modelos animales en los que se pueda demostrar eficientemente los procesos de transdiferenciación y de-diferenciación. Sin embargo, un estudio encontró que los hepatocitos humanos trasplantados al hígado de ratones vivos sufren transdiferenciación hacia células biliares (Tarlow et al., 2014). Dentro de los potenciales terapéuticos se tienen como blanco la regeneración de algunos órganos como la cóclea, corazón, pulmones, sistema nervioso, sistema renal e islotes pancreáticos de Langerhans, los cuales se describen en la tabla que se presenta a continuación, la cual es propuesta por Merrell y Stanger (Merrell y Stanger, 2016).

**Tabla 5.** Potenciales terapéuticos como blanco para la regeneración a partir de transdiferenciación.

ÓRGANO O TEJIDO	PATOLOGÍA O LESIÓN	OBJETIVO DE LA TRANSDIFERENCIACIÓN	INVESTIGACIONES ACTUALES
Cóclea	Pérdida de cabello coclear	Inducir la generación de células de soporte para las células capilares	Nuevos cabellos pueden ser generados desde las células circundantes de soporte por inhibición de la señalización de ephrin-B2 (Defourny et al., 2015).
Corazón	Regeneración del músculo cardíaco después de la lesión	Inducir la transdiferenciación de fibroblastos hacia cardiomiocitos	Los cardiomiocitos pueden ser generados desde fibroblastos in vivo por tratamiento con factores exógenos después de una lesión (Qian et al., 2012).
Alvéolos pulmonares	Regeneración del pulmón posterior a una lesión	Inducir que las células alveolares tipo I y II puedan convertirse tanto en células tipo I y II	Rastreando el linaje celular, las células alveolares tipo I y II han mostrado tener una plasticidad celular bidireccional (Jain et al., 2015).
Sistema nervioso	Enfermedad de Parkinson	Inducir la conversión de fibroblastos a neuronas dopaminérgicas, las cuales pueden ser trasplantadas.	Los fibroblastos pueden ser convertidos directamente a neuronas dopaminérgicas in vitro (Pfisterer et al., 2011).
Riñón	Enfermedad crónica renal	Inhibir la transdiferenciación patológica de pericitos a miofibroblastos fibróticos.	Inhibiendo la transdiferenciación de los pericitos se previene que se conviertan en miofibroblastos e induzcan fibrosis (Nakagawa and Duffield, 2013).
Islotes pancreáticos de Langerhans	Diabetes tipo I	Inducir transdiferenciación de células $\alpha$ o $\delta$ a células $\beta$ -pancreáticas.	Posterior a una ablación de células $\beta$ , un islote remanente de células puede transdiferenciarse para generar nuevas células $\beta$ (Chera et al., 2014; Thorel et al., 2010).

Fuente: Merrell y Stanger, 2016.

## 10.2 Dediferenciación

Thomas Hung Morgan propuso hace más de un siglo un concepto sobre el proceso regenerativo que utiliza la proliferación celular, al cual él nombró epimorfosis, y el proceso regenerativo que no la utiliza la definió como morfilaxis. La epimorfosis es el proceso regenerativo que involucra de-diferenciación y re-diferenciación, en el cual las células retornan a su identidad original, mientras que en la morfilaxis se involucra el proceso de transdiferenciación de células desde una identidad a otra (Morgan, 1902). Esto indica una probable ventaja evolucionaria para ser capaces de reemplazar células madre y células progenitoras desde células más diferenciadas (Merrell y Stanger, 2016).

La de-diferenciación en mamíferos es mucho más limitada que en anfibios e invertebrados y requiere de la expresión de señales inhibitorias, que se generan en casos de lesión tisular (Monje et al., 2010; Tata et al., 2013).

## CONCLUSIONES

En la mayoría de especies animales domésticas las células MSC, ESC e iPSC han sido obtenidas, no obstante sólo las MSC se han empleado con cierto margen de seguridad en terapia regenerativa. Las iPSCs aún representan cierto riesgo de desarrollo de tumores, adicionalmente, las iPSCs obtenidas de algunos animales y no son completamente “naïve”.

La reprogramación celular somática inevitablemente involucra un cambio de morfología en varias etapas que podrían ser eventualmente aprovechadas. El inicio de la expresión de genes de pluripotencia durante la MET demuestra la plasticidad que las células somáticas poseen, cualidad que en felinos no ha sido completamente explorada. Hasta el momento se ha demostrado en esta especie la expresión de genes de pluripotencia en MSC como Nanog, Klf4 y Oct4 y en fibroblastos la expresión de Nanog. En teoría estas células podrían tener un buen desempeño al ser sometidas a reprogramación hacia la pluripotencia. Sin embargo, en felinos parece ser un proceso complejo o poco conocido debido a la escasez de publicaciones que reporten experimentos realizados en reprogramación hacia multi y pluripotencia.

Los modificadores epigenéticos han demostrado tanto en células humanas como murinas la capacidad de remodelar la cromatina permitiendo la demetilación del ADN favoreciendo la expresión de genes relacionados con proliferación celular y reduciendo la retención de la memoria epigenética. Existen muchas moléculas disponibles que pueden ejercer efectos similares en la remodelación de la cromatina y en la inducción de la expresión de genes de pluripotencia. Estas moléculas tienen blancos de señalización diferente, ejerciendo un efecto en vías de señalización alternativas que inducen la expresión de factores de transcripción de determinados genes. El uso combinado de moléculas ha demostrado que mejora la eficiencia de reprogramación celular en varias especies.

Se ha demostrado que la inhibición de la vía de señalización TGF- $\beta$  habilita la reprogramación a través de la represión del fenotipo mesenquimal induciendo la MET. La inhibición de esta vía es uno de los métodos más empleados para inducir la pluripotencia y generalmente es bastante selectiva ya que bloquea específicamente los receptores para TGF- $\beta$  y de esta forma se bloquea cualquier señalización intracelular. Dentro de las moléculas que pueden inducir esta inhibición se encuentran A83-01 y SB431542, las cuales son añadidas a los cocteles de reprogramación y se ha reportado que la eficiencia mejora hasta 100 veces.

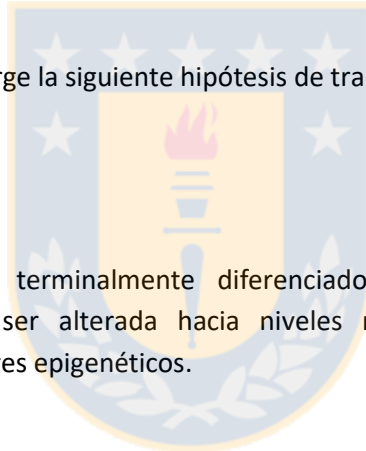
Prácticamente no existen estudios que aborden la reprogramación de estados intermedios (no iPSC), tales como las iMSC, las cuales pueden ser de gran utilidad, sobre todo en especies en peligro de extinción de las cuales hay pocas o ninguna muestras y por lo tanto resultaría difícil intentar aislar MSC, sin embargo su inducción a partir de tejido de fácil acceso pudiera garantizar células para futuras terapias regenerativas.

Los mecanismos de plasticidad de las células somáticas de humanos y murinos, han sido explorados ampliamente, no así los del gato doméstico, especie de gran importancia veterinaria y como modelo animal.

De lo discutido anteriormente surge la siguiente hipótesis de trabajo:

## **HIPÓTESIS**

La plasticidad de fibroblastos terminalmente diferenciados y de células madre adultas mesenquimales felinos puede ser alterada hacia niveles mayores de potencia, mediante dediferenciación con modificadores epigenéticos.



## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de inducción a multipotencia de las células somáticas felinas terminalmente diferenciadas (fibroblastos de gato y güiña) y la adquisición de mayor plasticidad de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo - AMSC felinas, bajo el efecto de remodeladores epigenéticos.

Objetivos específicos:

- Determinar el patrón de marcadores de superficie y de genes de pluripotencia en fibroblastos y AMSC felinas.
- Definir un protocolo para inducción a multipotencia de fibroblastos de origen felino.
- Evaluar los efectos de los remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento en la expresión de genes de pluripotencia, marcadores de superficie y potencial de diferenciación sobre fibroblastos y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo felino.
- Determinar correlación en la expresión de E-Cadherina y SNAIL en células somáticas (fibroblastos y AMSC) sometidas a reprogramación con remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Lugar de trabajo

La parte experimental de la investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Concepción, sede Chillán.

### 2. Obtención de las muestras

El estudio realizado fue aprobado por el comité de bioética y experimentación animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, permiso CBE-29-16. Se obtuvieron 5 muestras de piel (5mm aproximadamente) de la región abdominal ventral y 4 gramos aproximadamente de tejido adiposo omental (5 individuos), de gatas domésticas entre 1 y 3 años en promedio, durante el procedimiento de ovario-histerectomía y con consentimiento previo del propietario.

### 3. Cultivos celulares

#### 3.1 *Fibroblastos dérmicos de gata*

El cultivo de fibroblastos de piel se realizó a partir de tejido dérmico obtenido de la región abdominal de gatas. Una pequeña muestra de tejido extraída fue cortada en pequeños trozos (-5 mm<sup>2</sup>) utilizando instrumentos quirúrgicos estériles y se depositó en placas de cultivo de 35 mm, dejando secar por 15 minutos y luego se adicionó medio (DMEM/F12 libre de HEPES), suplementado con 30% SFB, 2,4 mM L-Glutamina, 2,4 mM piruvato de sodio, 10 U/ml ampicilina/amfotericina), 1% aminoácidos esenciales y no esenciales, 10 ng EGF y se cultivó a 38°C en 5% de CO<sub>2</sub> por 15 días. Los fibroblastos que crecieron del explante de tejido fueron transferidos a frascos de cultivo (T75) para su expansión. Los fibroblastos para inducción a la multipotencia fueron empleados entre el pasaje 3 y 5.

#### 3.2 *Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSC) de gato*

El aislamiento de las células madre mesenquimales (MSC) del tejido adiposo se realizó de acuerdo al protocolo reportado anteriormente por Kono y colaboradores con algunas modificaciones (Kono et al., 2014). El tejido adiposo se trozó y digirió en solución de colagenasa tipo I al 0.01% (Sigma - Aldrich) a 37°C durante 20 min. Después se filtró y centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. La fracción vascular estromal (SVF) se aisló como la fracción de sedimento y fue resuspendida en 1 ml

de solución 160 mM de cloruro de amonio por 5 minutos, luego se centrifugó a 1200 rpm por 15 minutos para eliminar el cloruro de amonio. El pellet se resuspendió en 1 ml de 20% de SFB / DMEM de los cuales se tomaron 10 ul para conteo celular y el resto de las células de la SVF se depositó en placas de cultivo de 60 mm con 20 % de SFB /DMEM a concentraciones de  $2 \times 10^6$  células / placa. Después de 4 días se tripsinizaron y subcultivaron en placas de 100 mm. Las células que se emplearon para los experimentos se encontraban en pase 3, con excepción del ensayo de formación de colonias para el cuál se emplearon AMSC en pase 1.

### 3.3 Cultivo de células SIHA y HK-293

Las células SIHA y HK-293 empleadas fueron obtenidas del banco de recursos genéticos perteneciente al Laboratorio de Biotecnología animal de la Universidad de Concepción. Las células fueron descongeladas en baño de María a 37°C por 30 segundos y posteriormente fueron resuspendidas en medio DMEM/F12 con 10% de SFB, luego se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en medio de cultivo estándar (DMEM/F12 libre de HEPES, suplementado con 10% SFB, 2,4 mM L-Glutamina, 2,4 mM piruvato de sodio, 10 U/ml ampicilina/anfotericina) y sembradas en placas de 100 mm. El recambio de medio se realizó cada 1 a 2 días y al alcanzar 70% de confluencia se realizó el pasaje celular.

### 4. Ensayo tiempo de doblaje celular

Las AMSC y fibroblastos dérmicos felinos fueron cultivados en placas de 35 mm, expandidas desde el pase 1 hasta el 5 a una concentración inicial de 6000-8000 células/cm<sup>2</sup>. Se realizó pase de las células al alcanzar el 70% de confluencia. El número de días para una célula doblar a cada pase fue estimado usando el programa *doubling time calculator* ([www.doubling-time.com](http://www.doubling-time.com)) en el cual se ingresa el número de células y el tiempo en cada pase (días u horas). Posteriormente los datos entregados son graficados para obtener la cinética de crecimiento.

### 5. Citometría de flujo

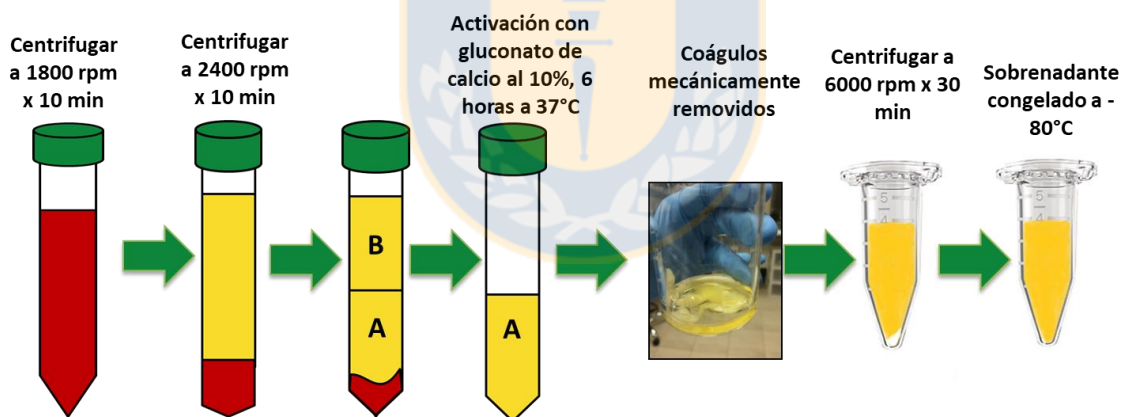
Para la caracterización por marcadores de superficie de los fibroblastos y AMSC felinas se emplearon los cultivos cercanos al 80% de confluencia y se suspendieron en PBS con 0,2% de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) y 1 mM de EDTA. Después de bloquear, las alícuotas de células ( $1 \times 10^5$  células por muestra aproximadamente) fueron incubadas en hielo por 30 minutos con anticuerpos primarios. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales producidos en ratón: anti-CD90 humano (1:200 BIO-RAD), anti-CD105 humano (1:25 BIO-RAD), anti-CD44 humano (1:200 SantaCruz Biotechnology), anti-MHCII felino (1:50 Kingfisher Biotech), anti-CD45 humano (1:200 Thermo Scientific) conjugado con PE. Como anticuerpo secundario se usó anti-mouse IgG



conjugado con PE (1:500 SantaCruz Biotechnology). Las células fueron analizadas con el equipo Attune® NXT Acoustic Focusing Cytometer, de Life Technologies.

## 6. Preparación del plasma rico en plaquetas – PRP

El plasma rico en plaquetas – PRP fue preparado de acuerdo al protocolo de González et al., 2016 con ligeras modificaciones (González, López, y Carmona, 2016). El PRP fue obtenido desde sangre venosa de una donante femenina de 25 años de edad. La sangre venosa (20 ml) fue obtenida desde la vena antecubital en tubos de 15 ml estériles que contenían citrato de sodio al 10% como anticoagulante. La sangre fue centrifugada a 1800 rpm por 10 minutos. Después de la primera centrifugación, dos capas fueron observadas claramente en el tubo. La capa amarilla superior consistía en plasma rico y pobre en plaquetas y la capa inferior estaba compuesta de eritrocitos y leucocitos. El sobrenadante (capa amarilla superior) fue recuperado en otro tubo y centrifugado a 2400 rpm por otros 10 minutos. La fracción de plasma obtenida fue arbitrariamente dividida en dos partes iguales, la mitad superior (B) y la mitad inferior (A). La mitad inferior fue separada en otro tubo y activada con 10% de gluconato de calcio por 6 horas a 37°C para estimular la liberación de los factores de crecimiento. Posteriormente, los coágulos fueron removidos mecánicamente desde la pared de los tubos y lo restante fue centrifugado a 6000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante resultante fue alicuotado y congelado a -80°C hasta su uso (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de la preparación del Plasma Rico en Plaquetas – PRP. Fuente: Elaboración propia.

## 7. Transfección estable de células SIHA y HK-293 con h-PDGF-B

La transfección estable de células SIHA y HK-293 se realizó con el vector de expresión PCI-Neo, en el cual fue clonado el ADNc codificante para el factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo B, humano (h-PDGF-B), junto a una cola de 6 histidinas (GenScript; Hong Kong), todo bajo el promotor de citomegalovirus humano (CMV). Tres placas de 100 mm (SIHA y HK-293) y una de 60 mm (SIHA) fueron transfectadas con 8 ug de ADN por placa. La concentración del plásmido usada

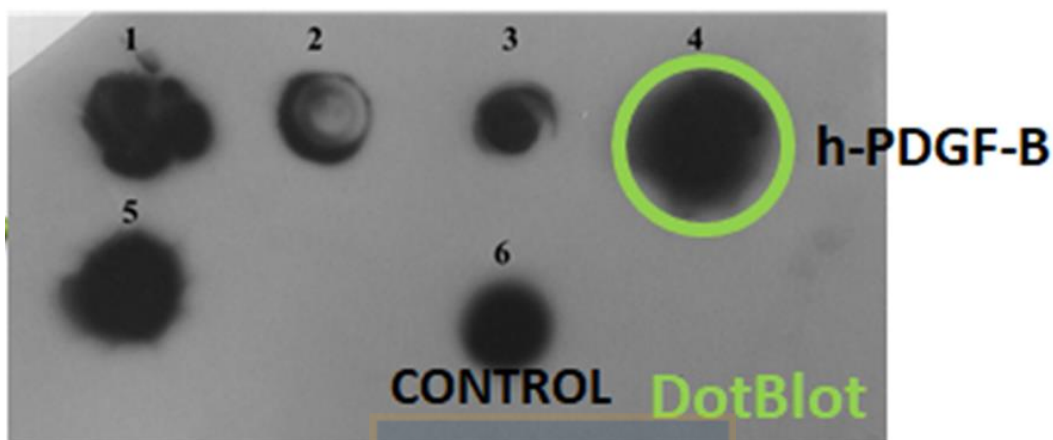
fue de 2,5 ug/ul. Se prepararon dos soluciones con un volumen final de 200 ul para las 4 placas que contenían 1: el ADN 13 ul + glucosa 187 ul; y 2: PEI 32 ul + glucosa 168 ul. Como controles de transfección se emplearon 2 placas de 60 mm con PLGW y una placa de 60 mm con eFlαGFP (10 ug ADN/placa). Las células se cultivaron por 48 horas, fueron expandidas y posteriormente cultivadas en medio de selección con HyQ G418 sulfato a diferentes concentraciones (400 ug/ml, 500 ug/ml, 600 ug/ml y 800 ug/ml) durante 28 días. Transcurrido ese tiempo, se identificaron las colonias de células SIHA sobrevivientes, las cuales son potencialmente portadoras del gen h-PDGF-B. Las colonias fueron tripisinizadas in situ, por medio de discos de clonaje (cloning discs; Sigma, St Louis, MO, USA) y expandidas en placas frescas. Para coleccionar el sobrenadante contenedor de h-PDGF-B secretada, las células se cultivaron por 48 horas en medio con o sin suero. El medio de cultivo fue recolectado y filtrado con membranas AMICON para separar proteínas por diferentes rangos de tamaño. Para este proceso se centrifugó inicialmente el medio de cultivo celular obtenido de las placas a 800 xg por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se recuperó el pellet. Se realizó una nueva centrifugación a 3000 xg por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante el cual se filtró a través de AMICON de 50 (Merck®). El sobrenadante filtrado y coleccionado, se centrifugó a 2500 xg por 10 minutos y fue posteriormente filtrado en otro AMICON 10 para concentrar proteínas con pesos moleculares entre 10-50 KDa. Todas las fracciones obtenidas fueron recuperadas y almacenadas a -80° hasta su posterior análisis y cuantificación.

Para purificar el h-PDGF-B, el filtrado final fue pasado por columna de afinidad para atrapar proteínas marcadas con histidina, usando el kit Miniprep HIS-Tagged Purification Takara BIO®, (Tokio, Japón) La columna fue inicialmente equilibrada con una concentración de 40 mM de imidazole y centrifugada a 11.000 xg por 1 minuto. El filtrado se removió y descartó para empezar a filtrar 600 ul de la muestra y se centrifugó nuevamente a 11.000 xg por 1 minuto, la fracción obtenida se guardó (fracción 1). Luego se agregó a la columna buffer de lavado preparado con Imidazole (300 ul) y se centrifugó bajo los parámetros anteriores. La fracción obtenida (fracción 2) fue guardada. Posteriormente se pasó por la columna sólo buffer de elusión con Imidazole y se centrifugó nuevamente. La fracción final (fracción 3) fue evaluada para determinar presencia de proteínas con cola de histidina por medio de la técnica Dot blot. 20 ul de estas fracciones fue empleado para cuantificar concentración de proteínas por el método Bradford.

#### **8. Dot Blot para identificación de proteínas con cola de histidina**

Para verificar la presencia del h-PDGF-B, 45 ul de cada muestra fueron cargados sobre una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific 0,45 µm). Posteriormente esta membrana fue bloqueada con una Tween TBS – Milk a temperatura ambiente en agitación constante. Luego se lavó 3 veces por 5 minutos con TTBS (solución de lavado) en agitación constante. Se realizó incubación con el anticuerpo 6x-His Tag HRP (ThermoFisher CAT N° MA1-21315-HRP) monoclonal a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 3 veces con TTBS por 5 minutos y se reveló en solución de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (General Electric, Seattle, WA, Estados Unidos) por tiempos

entre 30 segundos y 10 minutos, la señal que emite es captada por una película radiográfica y luego se observó el revelado del film.



**Figura 3.** Dot blot para identificación de proteínas con cola de histidina. 1) sobrenadante obtenido del cultivo de las SIHA con 10% SFB sin pasar por filtro AMICON de 50, 2) sobrenadante obtenido del cultivo de las SIHA sin SFB y sin pasar por filtro AMICON de 50, 3) concentrado del sobrenadante pasado por AMICON 50 y 10 sin SFB, 4) concentrado del sobrenadante pasado por AMICON 50 y 10 con 10% SFB y pasado a través de la columna de afinidad, 5) concentrado del sobrenadante pasado por AMICON 50 y 10 sin SFB y pasado a través de columna de afinidad, 6) control positivo que corresponde a EGF marcado con cola de histidina. Fuente: Elaboración propia.

### 9. Ensayo de proliferación celular de fibroblastos de gato doméstico con h-PDGF-B

Los fibroblastos fueron cultivados en placas de 60 mm con medio DMEM/F12 + 20%SFB + AAM + 2,4 mM L-Glutamina + 2,4 mM Piruvato + 1% Aminoácidos esenciales y no esenciales + EGF (10 ng/ml) hasta alcanzar 60% de confluencia. Posteriormente se reemplazó el medio DMEM/F12 + 0,5%SFB + AAM + Glutamina + Piruvato por 48 horas. Luego el medio fue reemplazado de acuerdo al tratamiento requerido por otras 48 horas. Los experimentos se realizaron en triplicado.

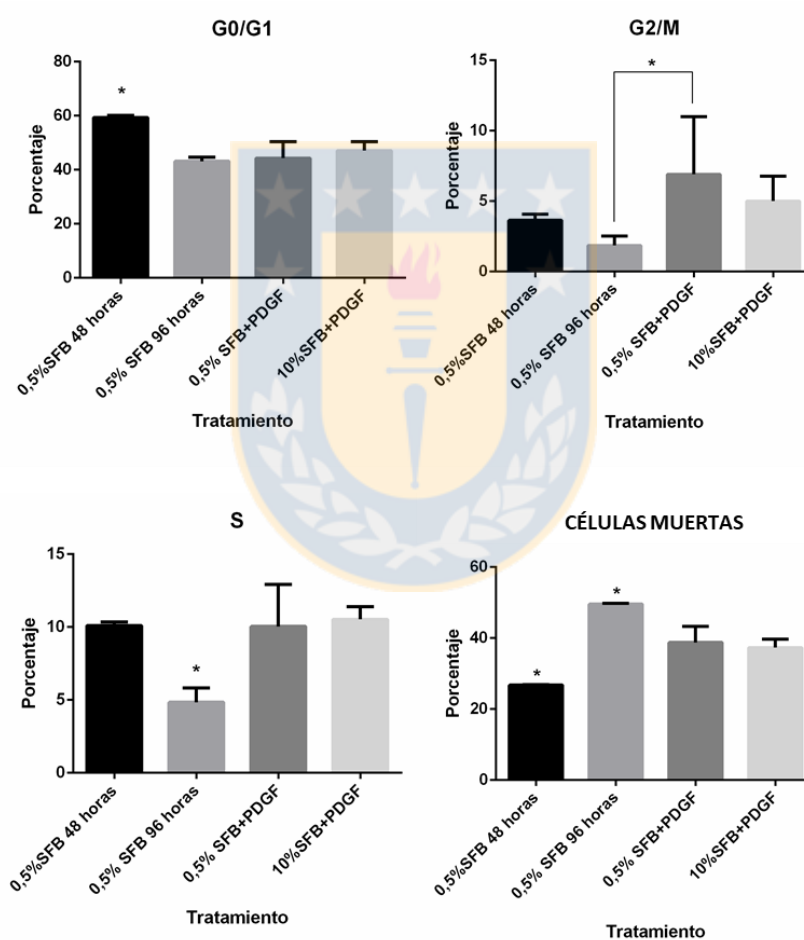
GRUPO CONTROL: DMEM/F12 + 20%SFB + AAM + Glutamina + Piruvato + Aminoácidos esenciales y no esenciales + EGF (10 ng)

GRUPO 1: DMEM/F12 + 0,5%SFB + AAM + Glutamina + Piruvato

GRUPO 2: DMEM/F12 + 0,5%SFB + AAM + Glutamina + Piruvato + 50ng/ml de PDGF

GRUPO 3: DMEM/F12 + 0,5%SFB + AAM + Glutamina + Piruvato + 25ng/ml de PDGF

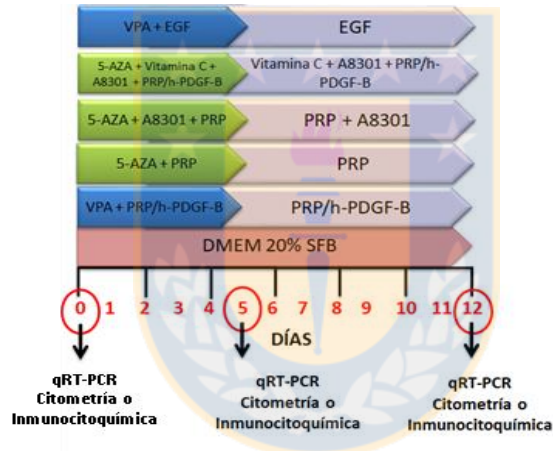
Posterior a los tratamientos las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. El pellet se lavó tres veces en PBS1X para eliminar el medio de cultivo. Las células fueron fijadas con 90% de metanol a -20°C por 10 minutos. Luego fueron lavadas dos veces con PBS1X e incubadas en una solución que contiene 50 µg/ml of ioduro de propidio y 100 µg/ml of RNAsa A, por 30 min a 37°C, en oscuridad. Posterior a la incubación las células fueron centrifugadas y el pellet resuspendido en 1 a 1,5 ml de Focussing 1X (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) para ser evaluadas por citometría de flujo (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) (Veraguas et al., 2017). Se evaluaron por lo menos 10.000 eventos por el canal BL2-A (574/26 nm filter) para estimar el porcentaje de fibroblastos en las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, S and G2/M). La población celular de menor tamaño y menor intensidad de fluorescencia fue considerada como la población con muerte celular (Figura 4).



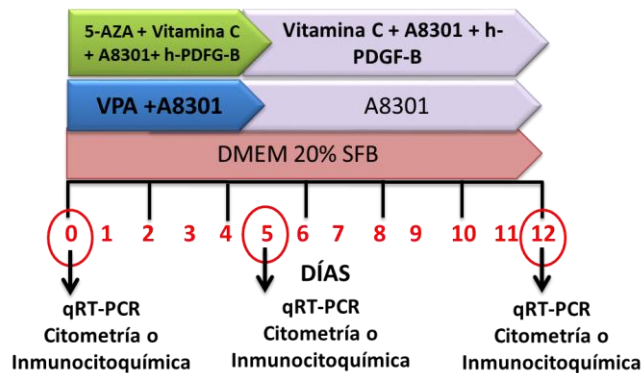
**Figura 4.** Citometría de flujo para evaluar ciclo celular en fibroblastos dérmicos felinos bajo el efecto de h-PDGF-B. Eje Y= porcentaje de células en la fase indicada del ciclo. En el eje X se aprecian los grupos de tratamientos, 1) 0,5% SFB sin h-PDGF-B por 48 horas, 2) 0,5% SFB sin h-PDGF-B por otras 96 horas, 3) 0,5% SFB + h-PDGF-B y 4) 10% SFB + h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.

## 10. Protocolos de inducción a multipotencia de fibroblastos (iMSC) y tratamientos de AMSC en medio condicionado

Para estos ensayos se emplearon combinaciones de moléculas considerando reportes previos (Chandrakanthan et al., 2016; Lai et al., 2017), con modificaciones. Las células (fibroblastos y MSC derivadas de tejido adiposo) de felinos en pase 3 fueron cultivadas inicialmente en medio DMEM/F12 al 10% SFB hasta alcanzar 70% de confluencia. El medio fue reemplazado por medio condicionado de acuerdo a los grupos de tratamientos (Tablas 6 y 7). Los fibroblastos y AMSC permanecieron en cultivo con modificadores epigenéticos (10  $\mu$ M de 5-AZA ó 1mM VPA) (Tabla 6 y 7) y factores de crecimiento (PRP, EGF o h-PDGF-B) los primeros 5 días y posteriormente continuaron en cultivo por otros 7 días con el mismo medio pero sin el remodelador epigenético (5-AZA y VPA) (Figuras 5 y 6). El medio fue cambiado cada 3 a 4 días y se tomó una fotografía diariamente para evaluar posibles cambios morfológicos de las células en cultivo. Los días 0, 5 y 12 de la inducción las células fueron colectadas para realizar análisis de expresión de genes y citometría de flujo. Al día 12 las células fueron sometidas a ensayos de diferenciación.



**Figura 5.** Esquema de reprogramación de fibroblastos felinos empleando como recurso de factores de crecimiento Plasma Rico en Plaquetas, EGF o h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 6.** Esquema de reprogramación de AMSCs empleando como factor de crecimiento h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 6.** Combinación de moléculas para inducción de células somáticas felinas empleando PRP.

COMBINACIÓN	DOSIS
VPA + PRP	1 mM + 1%
5 AZA + PRP	10 Mm + 1%
5 AZA + PRP + A8301	10 $\mu$ M + 1mM + 0.25 mM
5-AZA + Vitamina C + A8301 + PRP	10 $\mu$ M + 1mM + 0.25 mM + 1%
VPA+EGF	1Mm + 5 o 10 ng/ml
Medio MSC estándar	Estándar

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 7.** Combinación de moléculas para inducción de células somáticas felinas empleando h-PDGF-B.

COMBINACIÓN	DOSIS
VPA + PDFG	10 $\mu$ M +100 ng/ml
5-AZA + Vitamina C + A8301 + PDFG (4X)	10 $\mu$ M + 1mM + 0.25 mM + 100 ng/ml
Medio MSC estándar	Estándar

Fuente: Elaboración propia.

## 11. Ensayos de diferenciación para fibroblastos y AMSC reprogramados

Los ensayos de diferenciación a adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células musculares lisas (SMCs) y diferenciación neurogénica se realizaron como se ha descrito previamente (Gómez et al., 2015; Matsumoto et al., 2008) con modificaciones menores. Los fibroblastos inducidos a multipotencia y las AMSCs posterior a la reprogramación de 12 días con remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento, fueron sometidos a ensayos de diferenciación mesodérmica.

Para la diferenciación adipogénica, las células confluentes en un 80% se cultivaron en pase 3 para las AMSC y pase 3 ó 4 para los fibroblastos inducidos en placas de 12 pozos durante 7 días. Se empleó un medio de inducción adipogénica y otro de mantenimiento. El medio de inducción contiene DMEM 10%SFB suplementado con 1  $\mu$ M dexametasona, 0,5 mM 3-isobutil-L-metilxantina (Sigma-Aldrich) y 0,1 % insulina-transferrina-selenio-X (Invitrogen). El medio de inducción fue reemplazado por el medio de mantenimiento al día 4, el cual es similar al medio de inducción pero no incluye dexametasona ni 3-isobutil-L-metilxantina. El medio de mantenimiento se mantuvo hasta el día 7 de diferenciación. El recambio de medio se hizo cada 2 ó 3 días. Al día 7 de diferenciación las células fueron fijadas y teñidas con Oil Red O (Sigma -Aldrich) durante 20 min. El grupo control se mantuvo en medio DMEM/F12 con 10% SFB por el mismo tiempo.

Para la diferenciación condrogénica se empleó el protocolo descrito por Gómez et al 2015 con ligeras modificaciones. Las células se cultivaron en pase 2 para las AMSC y pase 3 ó 4 para los fibroblastos inducidos durante 28 días. Las células se cultivaron en placas de 12 pozos en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB o su respectivo tratamiento de inducción y fueron cultivadas a 38.5°C hasta alcanzar el 50% de confluencia, luego se cambió el medio por medio de diferenciación condrogénica (DMEM high glucose + 1x insulina-selenio-transferrina + 100 nM de dexametasona + 2,5% Plasma Rico en Plaquetas (PRP) + 1 µM/mL de ácido ascórbico 2-fosfato). Se realizó recambio del medio cada 48-72 horas. El grupo control se mantuvo en medio DMEM/F12 con 10% SFB por el mismo tiempo. Finalizado el tiempo de inducción condrogénica las células fueron fijadas en etanol al 96% durante una hora, y se tiñeron con azul de alcian pH 1.0 durante 2 horas. Las células fueron observadas en microscopio para evaluar tinción de glucosaminoglicanos y proteoglicanos en las células inducidas.

Para la diferenciación osteogénica, las AMSC en pase 2 y fibroblastos inducidos en pase 3 ó 4 fueron cultivadas en placas de 12 pozos hasta alcanzar el 80% de confluencia y posteriormente se incubaron durante 21 días con medio de inducción osteogénico que consta de DMEM con 10% SFB, 1% antibiótico/antimicótico, 0,1 µM de dexametasona, 0,2 mM de ácido ascórbico y 10mM de β-glicerol fosfato. Se hizo recambio de medio cada 2 a 3 días. Las células se incubaron a 38°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% por 10 min y se tiñeron con rojo de alizarina al 1% (Sigma -Aldrich) para detectar depósitos de calcio.

## **12. Ensayo formación de colonias fibroblastoides (CFU-F)**

Para evaluar la capacidad de clonogenicidad se realizó el ensayo de formación de colonias fibroblastoides siguiendo el protocolo de Gómez et al., (2015) con modificaciones. El ensayo se realizó en duplicado con diferentes densidades de siembra (250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 12 pozos con 1 mL de medio de DMEM/F12 al 15% SFB. Las células se examinaron dos veces por semana para verificar la presencia de unidades formadora de colonias (UFC) a partir de células individuales, y fueron incubadas durante 14 días con cambio de medio una vez por semana. Para la tinción de las colonias, las células se lavaron con PBS 1x dos veces y fueron teñidas con cristal violeta al 1% diluido en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas tres veces con agua destilada y se mantuvieron en posición invertida hasta que se secó la placa (Meirelles y Nardi, 2003). Un grupo de más de 50 células fue considerado como una colonia, las colonias fueron contadas en microscopio invertido Olympus CKX41.



### 13. qRT-PCR

Para esta técnica se empleó el protocolo descrito (Verma et al., 2012) con modificaciones. El ARN total fue extraído de las células felinas los días 0, 5, 12 de la inducción. Para la extracción del ARN se utilizó el protocolo de extracción del kit E.Z.N.A. El medio de cultivo fue removido de la placa de cultivo y luego se adicionó 500 ul del buffer de lisis TKR para lisar las células. Posteriormente se extrajo el contenido de la placa para llevarlo a tubos eppendorf de 1.5 ml. Se homogenizó por pipeteo y vórtex. Se adicionaron 500 ul de etanol al 70% y se homogenizó. Se transfirieron 700 ul de muestra a la columna del kit de extracción, Posteriormente se realizó centrifugación a 10.000 gx por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se reutilizó el tubo de colección. 500 ul de buffer de lavado I fueron adicionados para luego centrifugar a 10.000 gx por 30 segundos, se descarta el filtrado. 500 ul de wash buffer II, previamente diluido en etanol al 100%, fueron adicionados a la columna. Se centrifugó a 10.000 gx por 1 minuto. El filtrado fue descartado y se agregó nuevamente el wash buffer II para posteriormente, centrifugar el tubo de colección con la columna, a la misma velocidad anterior. El tubo de colección con la columna se centrifugó a 12.000 gx por 2 minutos para secar la columna. Posteriormente la columna se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y se adicionaron 30 ul de agua DEPC para realizar la última centrifugación a 14.000 gx por 2 minutos. El RNA total fue cuantificado utilizando el equipo Epoch™ de Bio Tek. Para ello se utilizó un volumen de muestra de 2 ul en el espectrofotómetro para micro-placas Epoch™.

El ARN total obtenido se sometió a tratamiento con DNaseI - Rnase-free (1U/500ng de ARN) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para eliminar contaminación de ADN genómico. Para la obtención del ADNc se utilizó la enzima M-MLV-RT (Invitrogen® Carlsbad, California, Estados Unidos). Para la transcripción a ADNc se utilizaron 500 ng de ARN de cada muestra, 1µL de Random Hexámeros y 1 µL de Buffer annealing, y fueron incubados durante 5 minutos a 65°C, posteriormente, se adicionó 10 µL de 2x First-Strand Reaction Mix y 2µL de Enzima M-MLV-RT/RNaseOUT™, y se incubaron nuevamente a 25°C por 10 minutos, luego 50°C por 50 minutos y finalmente, 85°C por 5 minutos. Se determinó la concentración del producto obtenido utilizando 2 µL de éste, en el espectrofotómetro para micro-placas Epoch™ de BioTek (Winooski, Vermont, Estados Unidos). Los ADNc obtenidos se congelaron a -20°C hasta su uso. Las reacciones se llevaron a cabo en triplicado.

El método DDcT fue usado para realizar la evaluación de los datos de la RT-qPCR. El valor Ct fue obtenido del análisis de ajuste de la curva restada a la línea base de PCR, y normalizado para diferentes cantidades de ADNc usando DcT ((Ct para SDHA como gen normalizador) – (Ct para el gen de interés)). Luego, el DDcT fue calculado por la substracción de DcT de cada muestra desde el DcT de una muestra de ANDc de referencia (grupo control). La disminución o el incremento de la expresión en el n-fold chance fueron calculados para las células usando la fórmula 2-DDcT.

Para el análisis de las muestras, se realizó la reacción de PCR con el kit SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline) en un volumen final de 10 µL (mezcla: 5µL de Sensimix 5x, agua estéril libre de nucleasas, 10 pmoles de cada partidor y 100 ng de ADNc). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa



PrimerQuestSM (IDT, USA), a partir de las secuencias publicadas para cada gen en NCBI (Tabla 8). Se emplearon dos réplicas de cada muestra por cada gen (réplicas técnicas). Las reacciones fueron corridas en el equipo Stratagene-Mx3000P™ PCR en Tiempo Real (Stratagene, EE.UU). El “crossing point” (CP) se calculó con el software apropiado incorporado en el equipo. El nivel de expresión de transcripto de cada muestra fue normalizado con SDHA (Succinato deshidrogenasa). La normalización se realizó utilizando los niveles de expresión de SDHA como cociente de los valores obtenidos para cada gen.

**Tabla 8.** Secuencias de cebadores específicos de gato doméstico para detectar expresión de genes endógenos felinos.

Cebadores	Secuencia	Tamaño del amplificado	Temperatura de Producto	Número de acceso NCBI
SDHA	F: 5'- GGACCATGAATTTGACGCGG-3'	103 bp	59°C	XM_011287219.1
	R: 5'- TCGGAGCCTTTCACAGTGTC -3'			
OCT4	F: 5'- CCGAAAGAGAAAGCGAACAAG -3'	136 bp	58°C	NM_001173441.1
	R: 5'- GACCACATCCTTCTCCAGC -3'			
NANOG	F: 5'- ATGCACCCTTGCGAATGTCA -3'	120 bp	55°C	NM_001173442.1
	R:5'- TTA CTCTGGGGCTGGTGGAA -3'			
E-CADHERIN A	F: 5'- CCCATCTTTGTGCCTCTCCA-3'	142 bp	57,9°C	XM_003998189.2
	R: 5'- TGGCAGCATCCCTCAAATC -3'			
SNAIL	F: 5'- TTTCTCGTCAGGAAGTCCG -3'	125 bp	59°C	XM_011280750.1
	R: 5'- AGAGAGTCCCAGATGAGCGT -3'			
RUNX2	F: 5'-TGACACTGCCACTTCTGACTTCTG -3'	120 bp	59°C	XM_002742288.1
	R: 5'-AGGGATGAAATGCTTGGAAGTGC-3'			
COL2A1	F: 5'- CGGACCCGCTGTAAGGA -3'	118 bp	58°C	XM_023256993.1
	R: 5'- TCACCTGGCTTCCACCTT -3'			
PPARY	F: 5'-TCGGTTTCAGAAGTGCCTTGCT -3'	101 bp	60°C	NM_001113176.1
	R: 5'-TGGAGATCTCCGCCAACAGCTTTT-3'			
SOX9	F: 5'-CGTCAACGAATTCGACCAGTACCT -3'	101 bp	58°C	XM_023243815.1
	R: 5'-TGCTGTTGATGCCGTAGCTC-3'			

AGGRECAN	F: 5'-GCACTGTGGATGTAAGTGGCGAAT -3' R: 5'-ACCCTCCACGAACTCAGAAGTGAT-3'	104 bp	60°C	XM_023254934.1
CD44	F: 5'- TCGAGGCACCCATTTCATAGACA -3' R: 5'-ATCAGCTGGCTACTCTGTTGGACT-3'	128 bp	60°C	XM_019812274.2
CD90	F: 5'- AGCACGTGATCTTTGGCACTATGG -3' R: 5'-ACATGTGTACATCCCCTCGTCCTT-3'	134 bp	59,5°C	XM_027036734.1
CD105	F: 5'- ATCACCTTTGGCGCCTTCCTTATC -3' R: 5'-GTGGTTGGTGCTACTGCTTTCTGA-3'	144 bp	59,4°C	XM_027035191.1
MHCII	F: 5'-TGAGCTGAAGTGGAGATGCTGACA-3' R: 5'-ACTGAACCCAGGGCAAACCAA-3'	138 bp	60,1°C	NM_001128072.2
ACTA2	F: 5'-GCCCAGCACCATGAAGATCAAGA-3' R: 5'-CCTGTTTGCTGATCCACATCTGCT-3'	119 bp	59°C	XM_003993871.5
MAP2	F: 5'- GCCCAGTGACTGCCAAAGATAGTT-3' R: 5'-ATGTGGGCATCTTTGGGTAAGGTG-3'	115 bp	59°C	XM_019838598.2

Fuente: Elaboración propia.

#### 14. Inmunocitoquímica

Se realizó inmunocitoquímica de fibroblastos reprogramados al día 0, 5 y 12. Las células fueron fijadas al 4% de paraformaldehído por 5 minutos. Posteriormente se realizó la incubación por una hora con el anticuerpo primario POU5F1 (1:200, Thermo Scientific) dirigido hacia el factor de transcripción Oct4 y anti-human vimentin (1:50, Biorad) para identificar expresión de la proteína vimentina para posteriormente incubarlo por una hora con un anticuerpo secundario anti conejo IgG conjugado con peroxidasa.

#### 15. Ensayos de migración

Para determinar la capacidad de migración de las células, se realizaron los ensayos de insertos (transwell) y rasguño (scratch). Las AMSCs de gato y güiña fueron cultivadas en placas transwell de 6.5 mm de diámetro sobre filtro con poros de 8-µm (Corning Costar, Cambridge, MA). En la cámara inferior se colocó el agente quimioattractante (1% de Plasma Rico en Plaquetas-PRP humano). Como control se empleó medio sin suero fetal bovino. Las células fueron incubadas por

un periodo de 3h a 38°C a 5% CO<sub>2</sub>; las células que migraron quedaron atrapadas en la membrana y fueron teñidas, luego fueron contadas al microscopio. En el ensayo de migración por Scratch fue realizado con el mismo quimioattractante. Las células fueron sembradas en una placa de 6 pozos hasta un 80% de confluencia y posteriormente con una punta de 1000 ul se realizó una línea por toda la mitad del pozo para generar discontinuidad del cultivo y dejar una zona sin células de aproximadamente 0.4–0.5 mm de amplitud. El medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio sin suero fetal bovino (control) y medio con PRP al 1%. La migración fue observada a las horas 0, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 y cada uno de los pozos fue fotografiado. Las imágenes fueron analizadas con el software Motic Images 2.0.

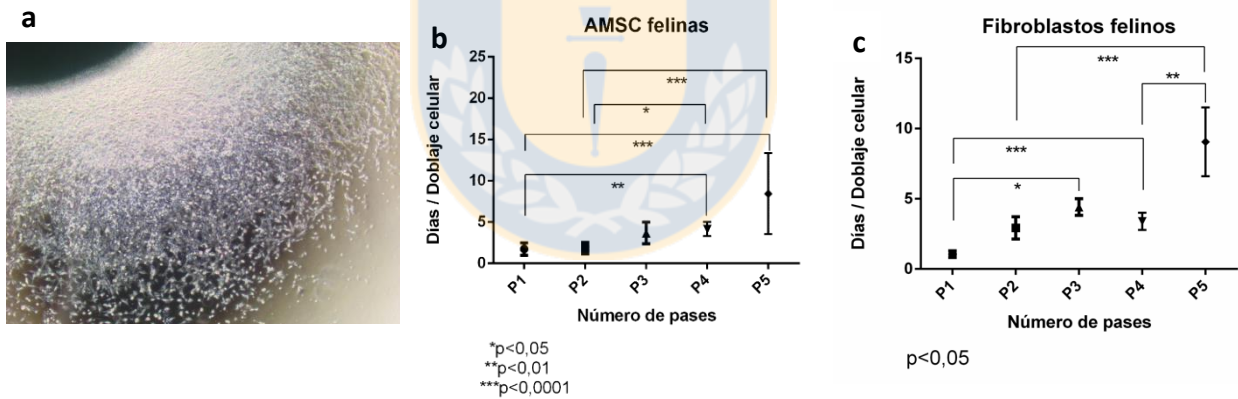
## **16. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron inicialmente con estadística descriptiva para análisis de cinética de crecimiento y ensayos de actividad biológica del h-PDGF-B. Se evaluó la distribución normal de los datos y la homogeneidad de varianzas. La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada como prueba No paramétrica para comparaciones intergrupales (qRT-PCR) de los diferentes tratamientos de inducción a multipotencia y reprogramación. Los experimentos de inducción a multipotencia se realizaron por triplicado. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 6. P<0,05 fue considerado significativo. Se empleó la prueba t para identificar diferencias entre promedios de dos grupos para determinados análisis de diferenciación mesodérmica. El ANOVA de dos vías y el test de Tukey de múltiples comparaciones fue empleado para evaluar clonogenicidad de células madre mesenquimales y fibroblastos. El test de Spearman se empleó para evaluar correlación entre la expresión de E-Cadherina y SNAIL.

## RESULTADOS

### Determinación del patrón de marcadores de superficie y de genes de pluripotencia en fibroblastos y AMSC felinas.

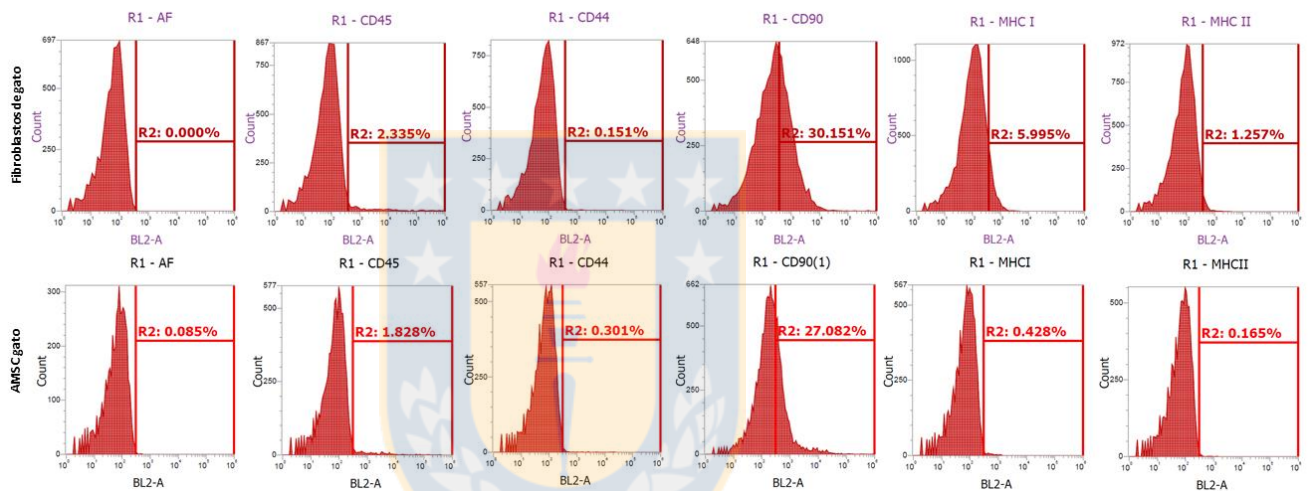
Para la caracterización de fibroblastos y AMSC felinas se realizaron ensayos de proliferación celular, ensayos de diferenciación mesodérmica, análisis de la expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie y adicionalmente se evaluó la capacidad de migración en las AMSCs. Para caracterización y ensayos posteriores se emplearon 4 líneas celulares de fibroblastos de gata doméstica, una línea de fibroblastos de güiña, 4 líneas de AMSCs (células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo) de gato doméstico y una línea celular AMSC de güiña. Las AMSCs proliferaron rápidamente en los primeros 4 pases celulares, al quinto, se observó una notable ralentización del crecimiento (Figura 7). De modo general, las líneas celulares entraron en senescencia después del quinto pasaje celular. En el caso de los fibroblastos, las células empezaron a ser visibles alrededor de los explantes de piel a partir de día 3 o 4 (Figura 7 derecha). Para el día 7 las placas se encontraban en confluencia y se realizó el primer pase celular en la mayoría de líneas. Se realizó expansión hasta los pases necesarios para realizar los experimentos y así mismo se evaluó la cinética de crecimiento a partir del pase 1. Los tiempos de doblaje celular fueron muy similares en todas las líneas hasta el pase 3, sin embargo, para el pase 4 y 5 los tiempos de doblaje celular de cada línea fueron mayores.



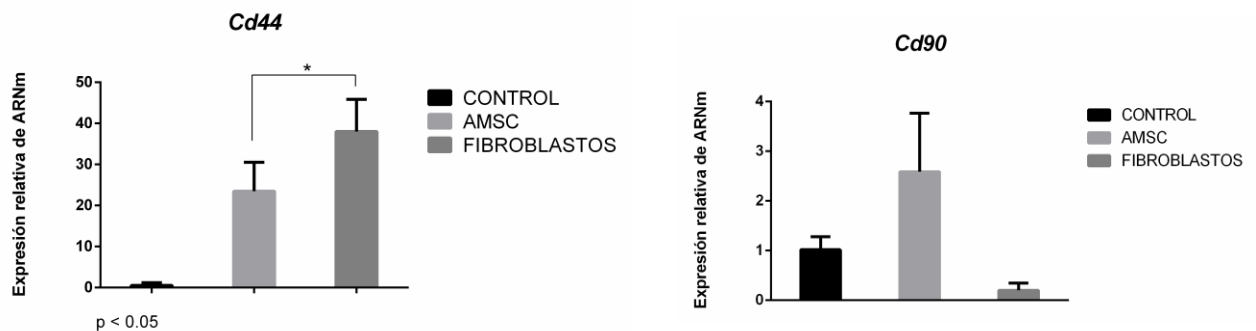
**Figura 7.** (a) Explante de piel de fibroblastos felinos al día 5 de cultivo. Magnificación 4x (panel izquierdo). (b) Cinética de crecimiento de los fibroblastos felinos empleados en el experimento (panel derecho) (n = 4). (c) Cinética de crecimiento de AMSCs (n = 4). Para comparar las diferencias en promedios de días de doblaje celular se empleó el test de Kruskal Wallis. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia.

### Patrón de marcadores de superficie de fibroblastos y AMSCs

Se realizó citometría de flujo para caracterizar la expresión de CD44, CD45, CD90 y MHCII en fibroblastos y AMSCs. Los fibroblastos presentaron un bajo porcentaje de positividad para todos los marcadores, CD44 0,060%, CD45 1,124% CD90 30,1% y MHCII 0,019% (Figura 8). En las AMSCs, la expresión de los marcadores fue cercana a cero, solo CD90 27% para AMSC de gato. Debido a la baja positividad presentada con los anticuerpos empleados se decidió evaluar la expresión de los marcadores CD44 y CD90 de fibroblastos por qRT-PCR y comparar su expresión con AMSC (Figura 9). La expresión de CD44 fue significativamente mayor en fibroblastos y para el marcador CD90 no se encontró diferencia estadística significativa entre fibroblastos y AMSC.



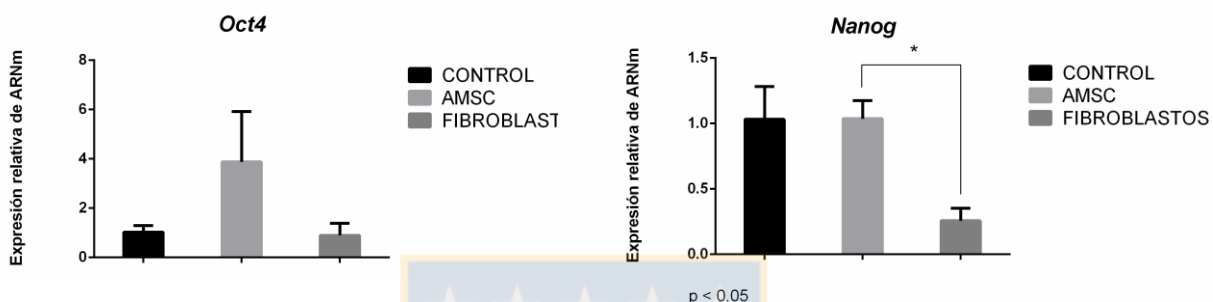
**Figura 8.** Citometría de flujo para evaluar expresión de marcadores de superficie en fibroblastos y AMSC de gata doméstica. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 9.** Expresión de marcadores de superficie CD44 y CD90 en fibroblastos y AMSC felinas. Para comparar las diferencias en promedios se empleó el test de Kruskal Wallis. \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

### Expresión de genes de pluripotencia OCT4 y NANOG en fibroblastos y AMSCs felinos

La expresión de genes de pluripotencia OCT4 y NANOG en fibroblastos fue evaluada junto con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSC) para comparar niveles de expresión. Como control se empleó tejido testicular de gato doméstico para normalizar la expresión. El análisis de qRT-PCR reveló que tanto los fibroblastos como las AMSC de gato doméstico expresaban OCT4 y NANOG, siendo NANOG significativamente mayor en AMSC (Figura 10).

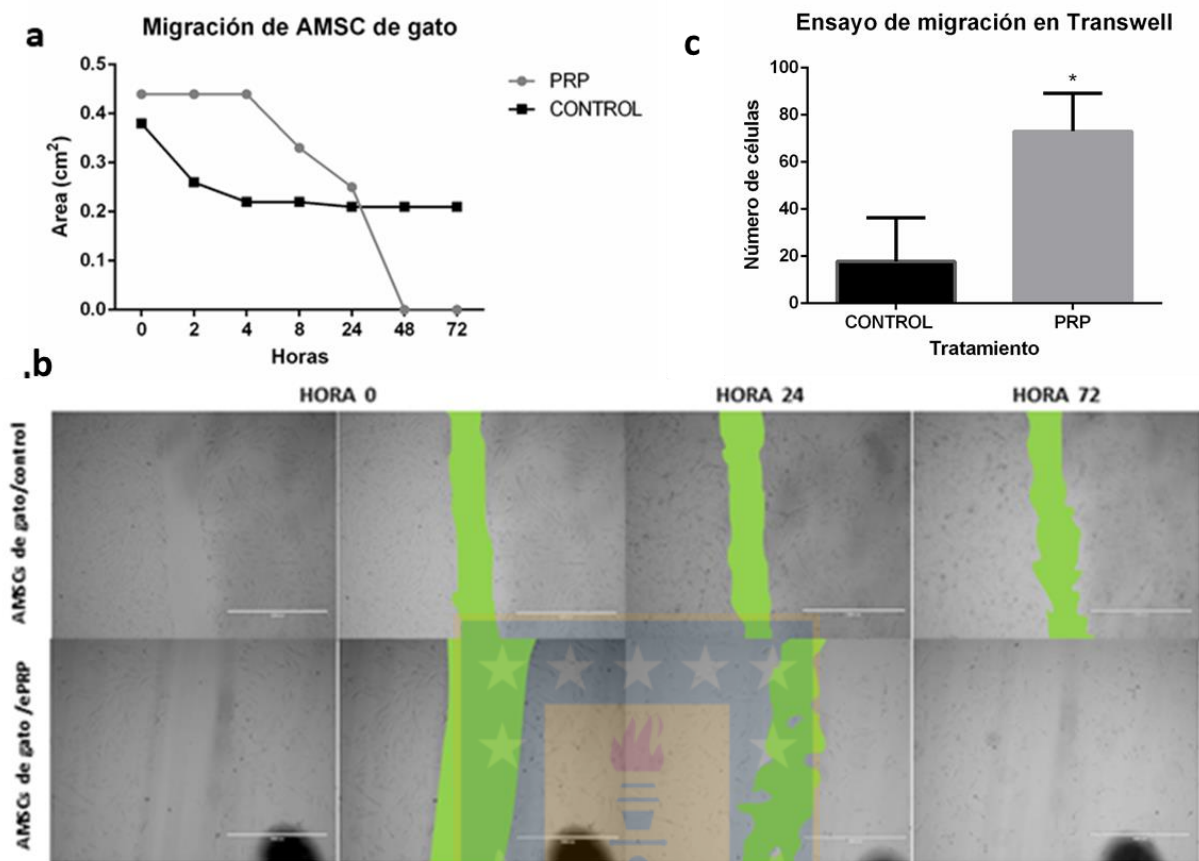


**Figura 10.** Expresión relativa de mRNA para OCT4 y NANOG en fibroblastos (n = 4) y AMSC (n = 4) de gato doméstico. Para comparar las diferencias en promedios se empleó el test de Kruskal Wallis. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

De este modo, se determinó que los fibroblastos poseen un fenotipo  $(CD44/OCT4/NANOG)^+/CD90$ , mientras que las AMSc fueron  $(CD44/OCT4/NANOG/CD90)^+$ , siendo significativamente mayor la expresión de CD44 en fibroblastos y OCT4, NANOG y CD90 mayor en AMSC.

### Ensayos de migración en AMSC de gato

Con el fin de evaluar otras características de multipotencia de las AMSC de gato se realizó un ensayo de migración para evaluar la capacidad migratoria de las células. Este ensayo de migración se evaluó por dos métodos distintos con resultados similares. El primer método fue por rasguño "Scratch" y el segundo migración en Transwell. Como quimioattractante se empleó plasma rico en plaquetas. Con el primer método se pudo observar migración completa de las células a las 72 horas, llenando el espacio creado en la placa, mientras que el grupo control no presentó migración a las 72 horas (Figura 11 a y b). En el ensayo de migración en transwell se observó un mayor número de células que migraron a través del pozo cuando estuvieron en contacto con el factor de crecimiento respecto al grupo control (Figura 11 c.)

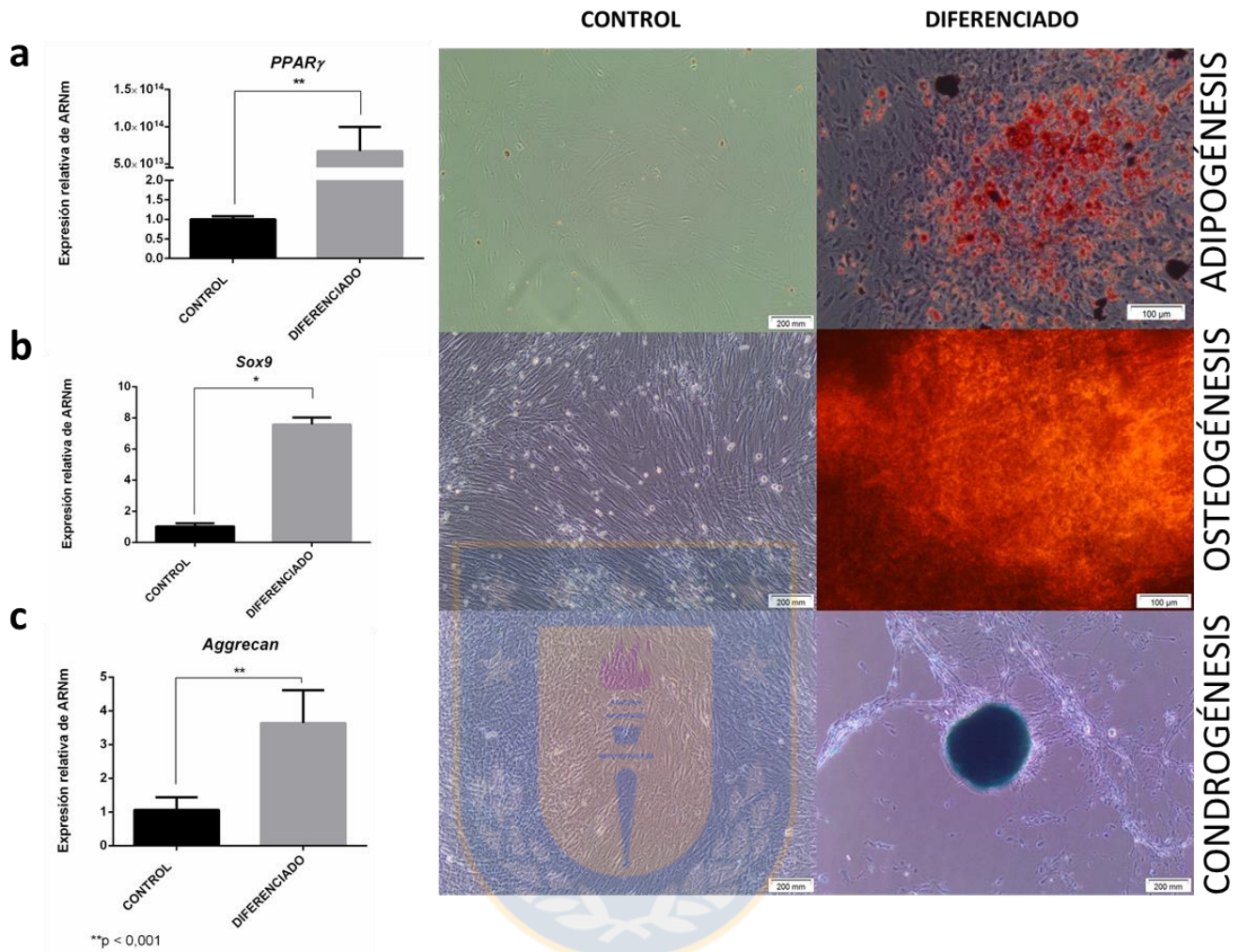


**Figura 11.** Ensayos de migración por Scratch y en transwell de AMSCs de gato y güiña. Figuras a y b corresponden a migración por Scratch; figuras c y d corresponden a los ensayos de migración en Transwell. Fuente: Elaboración propia.

#### *Ensayos de diferenciación mesodérmica en AMSC de gato*

Para evaluar capacidad de diferenciación de las AMSC de gato se realizaron ensayos de diferenciación hacia adipogénesis, condrogénesis y osteogénesis. Las AMSC de gato se diferenciaron hacia los tres linajes mesodérmicos. Adicionalmente se evaluó la expresión de genes relacionados con la diferenciación. La expresión de PPAR $\gamma$  fue significativamente mayor en las AMSC de gato diferenciadas hacia adipogénesis (Figura 12a). Sox9 también presentó una expresión significativamente mayor en AMSC de gato que fueron diferenciadas hacia el linaje osteogénico (Figura 12b). Adicionalmente, las AMSC sometidas a diferenciación condrogénica presentaron incremento en la expresión de Aggrecan (Figura 12c).





**Figura 12.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSCs de gato. (a) Expresión de PPAR $\gamma$  de células sometidas a ensayos de diferenciación adipoogénica, se observa el control y las células diferenciadas con vacuolas lipídicas teñidas con Oil Red. (b) Expresión de Sox9 de células en diferenciación osteogénica, se observa el control y las células diferenciadas positivas a la tinción con rojo alizarina y (c) expresión de Aggrecan en células en ensayos de diferenciación condrogénica, se observa el control y el pellet formado positivo a la tinción con azul de alcian. Las diferencias en la expresión de los grupos control y diferenciado fue evaluada por medio de la prueba t. (n=4). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia.



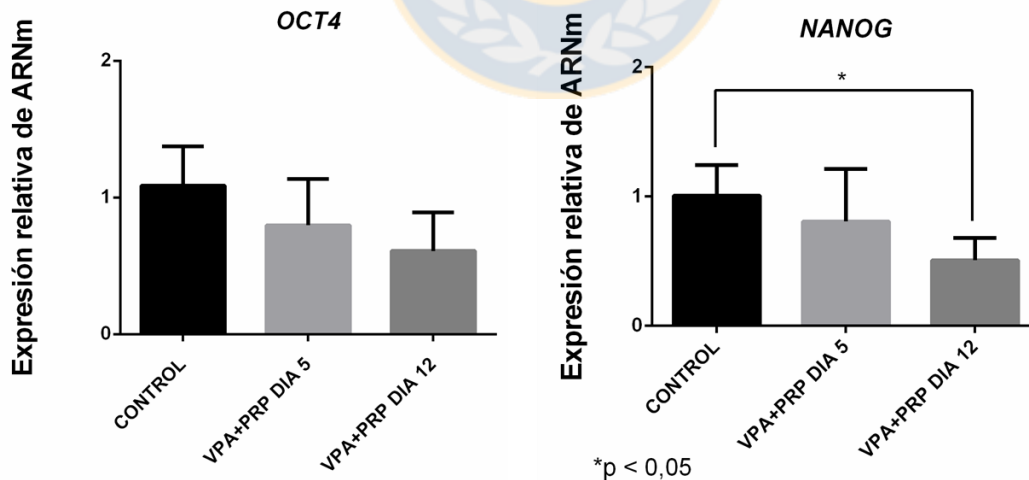
## Reprogramación de fibroblastos empleando ácido valproico (VPA) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP) como factor de crecimiento

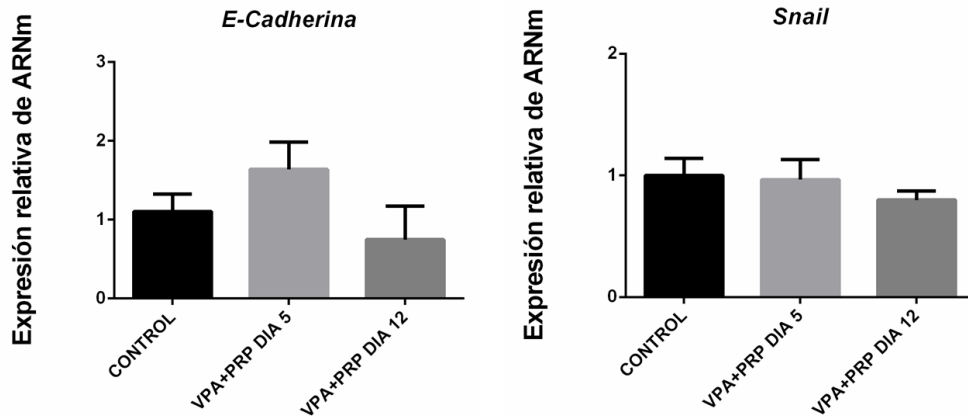
Para realizar este experimento, los fibroblastos dérmicos de gato fueron expandidos hasta P3 para luego ser inducidos con remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento.

En algunos experimentos se suplantó el PRP por factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG) puro, obtenido en el laboratorio (ver figura 3). Como remodeladores epigenéticos se emplearon ácido valproico (VPA) y 5- Azacitidina. Adicionalmente se evaluó el efecto de la molécula VPA y uno de los factores de crecimiento presentes en el plasma rico en plaquetas, EGF (Factor de Crecimiento Epidermal).

### *Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con VPA+PRP*

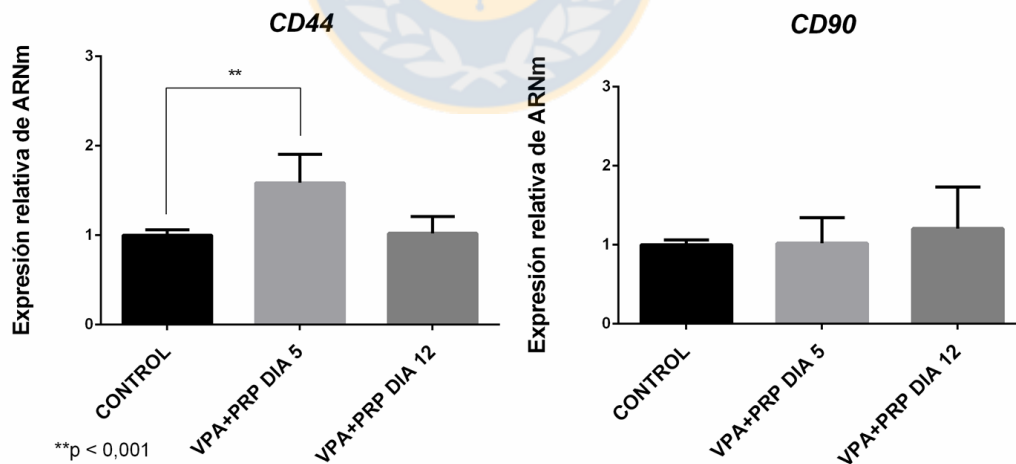
Con el tratamiento con VPA+PRP la expresión de OCT4 no presentó diferencia estadística en los días evaluados con respecto al control mientras que la expresión de NANOG disminuyó significativamente al día 12 (Figura 13). Adicionalmente se evaluó si el uso de VPA+PRP podría inducir la expresión de E-Cadherina y regular a la baja la expresión del gen SNAIL, el cual se expresa principalmente en células diferenciadas y una disminución en sus niveles de expresión podría ser sugerente de de-diferenciación. Respecto a la expresión de E-Cadherina y SNAIL tampoco se observó una diferencia estadística entre los tratamientos y el control (Figura 13).

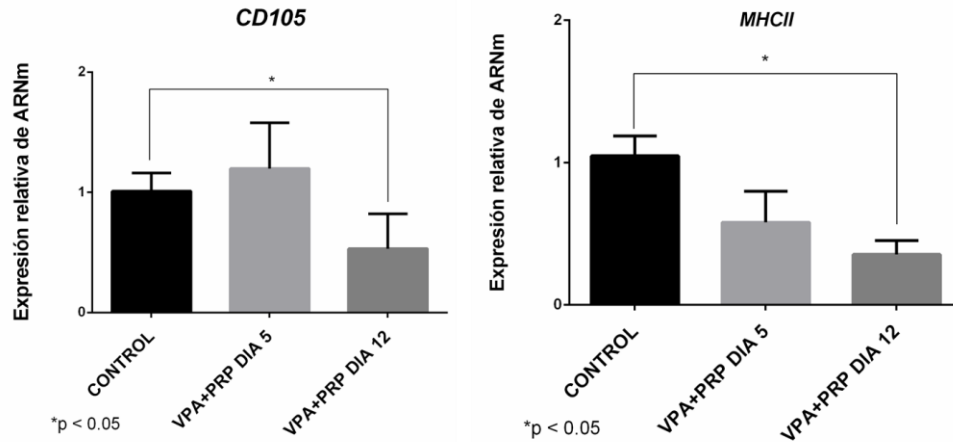




**Figura 13.** Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos de gata doméstica sometidos a diferentes tratamientos de reprogramación empleando VPA+PRP. (n=3). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

Al evaluar a nivel de ARNm la expresión de marcadores de superficie CD44, CD90, CD105 y MHCII, se encontró una mayor expresión de CD44 al día 5 de tratamiento con VPA+PRP, CD90 no presento diferencias en su expresión, mientras que CD105 y MHCII disminuyeron su expresión al día 12 del tratamiento (Figura 14).

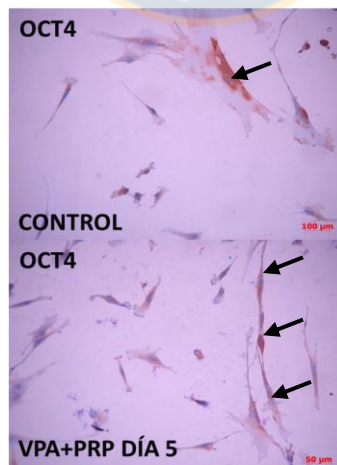




**Figura 14.** Expresión de marcadores de superficie CD44, CD90, CD105 y MHCII en fibroblastos felinos reprogramados con VPA+PRP. (n=3). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia.

#### *Inmunocitoquímica para Oct4, Cd44 y Cd90 en fibroblastos felinos reprogramados con VPA+PRP*

La línea 4 de fibroblastos felinos que fueron reprogramados con VPA+PRP fue evaluada por medio de inmunocitoquímica para identificar las expresión de Oct4, Cd44 y Cd90 al día 0 y al día 5. La expresión de la proteína Oct4 fue identificada tanto en el grupo control como al día 5, esta expresión se observó principalmente a nivel citoplasmático y en menor proporción a nivel perinuclear (Figura 15). Respecto a la expresión de Cd44 y Cd90 ninguna célula mostró positividad.

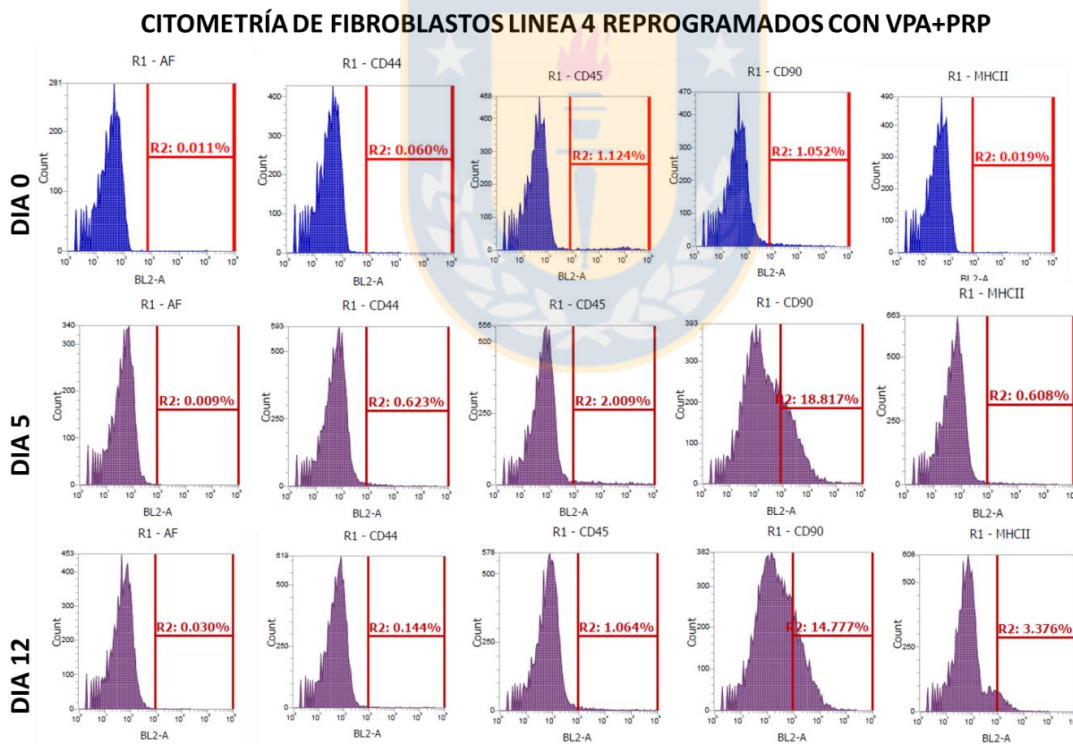


**Figura 15.** Inmunocitoquímica para Oct4 en fibroblastos felinos tratados con VPA+PRP. Los fibroblastos fueron positivos para la expresión de Oct4 al día 0 y al día 5 del tratamiento con VPA+PRP, observándose principalmente a nivel citoplasmático y perinuclear. Para los marcadores

de superficie Cd44 y Cd90 no se observó ninguna célula positiva para su expresión, ni en el grupo control o al día 5 del tratamiento con VPA+PRP. Se muestran las fotos negativas para Cd44 y Cd90 al día 5 de la reprogramación. Fuente: Elaboración propia.

*Citometría de flujo para evaluar expresión de marcadores de superficie en fibroblastos felinos reprogramados con VPA+PRP*

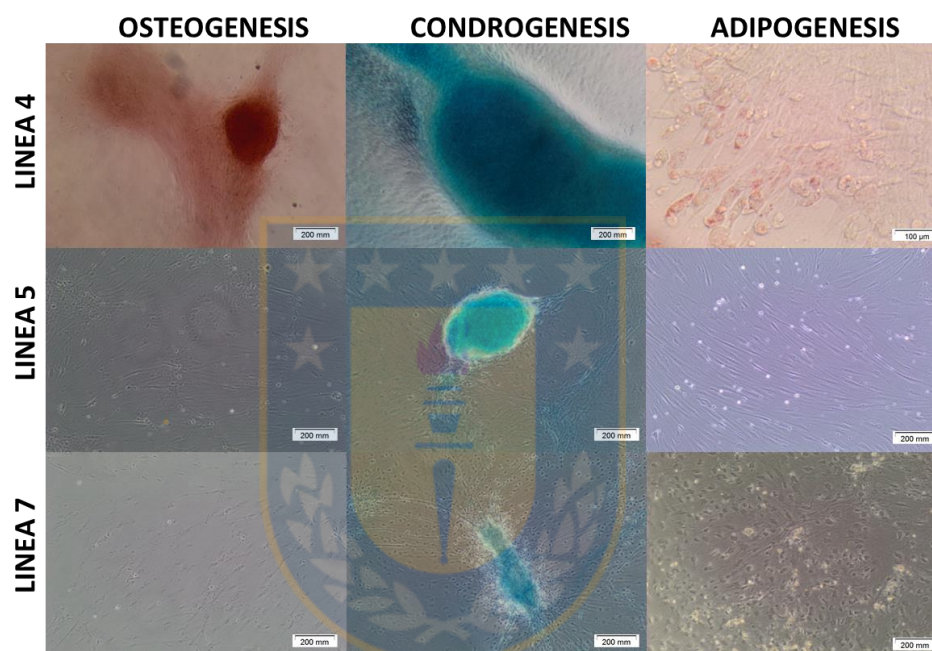
Se evaluó la expresión de marcadores de superficie Cd44, Cd45, Cd90 y MHCII en la línea 4 por citometría de flujo. Sin embargo, la expresión de los marcadores para los cuales se esperaba positividad fue muy baja. En el día 0 de la reprogramación la expresión para Cd44 fue de 0,060%, CD45 de 1,12%, Cd90 de 1,05% y MHCII de 0,019%. El día 5 del tratamiento con VPA+PRP la expresión de Cd44 fue de 0,62%, Cd45 de 2%, Cd90 de 18,8% y MHCII de 0,6%. Para el día 12 la expresión de estos marcadores fue Cd44 0,14%, Cd45 1,06%, Cd90 14,8% y MHCII de 3,3% (Figura 16). Este método no fue efectivo para evaluar la expresión de marcadores de superficie, así como tampoco fue posible evaluar la expresión de estos marcadores por inmunocitoquímica, probablemente por baja especificidad antígeno-anticuerpo.



**Figura 16.** Citometría de flujo para evaluar expresión de marcadores de superficie Cd44, Cd45, Cd90 y MHCII en fibroblastos de gato doméstico (línea 4) reprogramados con VPA+PRP. Fuente: Elaboración propia.

### *Ensayos de diferenciación mesodérmica en fibroblastos de gato doméstico reprogramados con VPA+PRP*

Para evaluar si alguno este tratamiento tenía efecto sobre la plasticidad de los fibroblastos felinos y una posterior capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos, las células sometidas a reprogramación fueron posteriormente cultivadas en medios de diferenciación específicos para estos linajes. De las líneas sometidas a reprogramación y posterior diferenciación, una línea (línea 4) demostró capacidad de diferenciación a linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico representado por cambios morfológicos y tinción positiva a rojo alizarina, azul de alcian y Oil Red respectivamente (Figura 17).



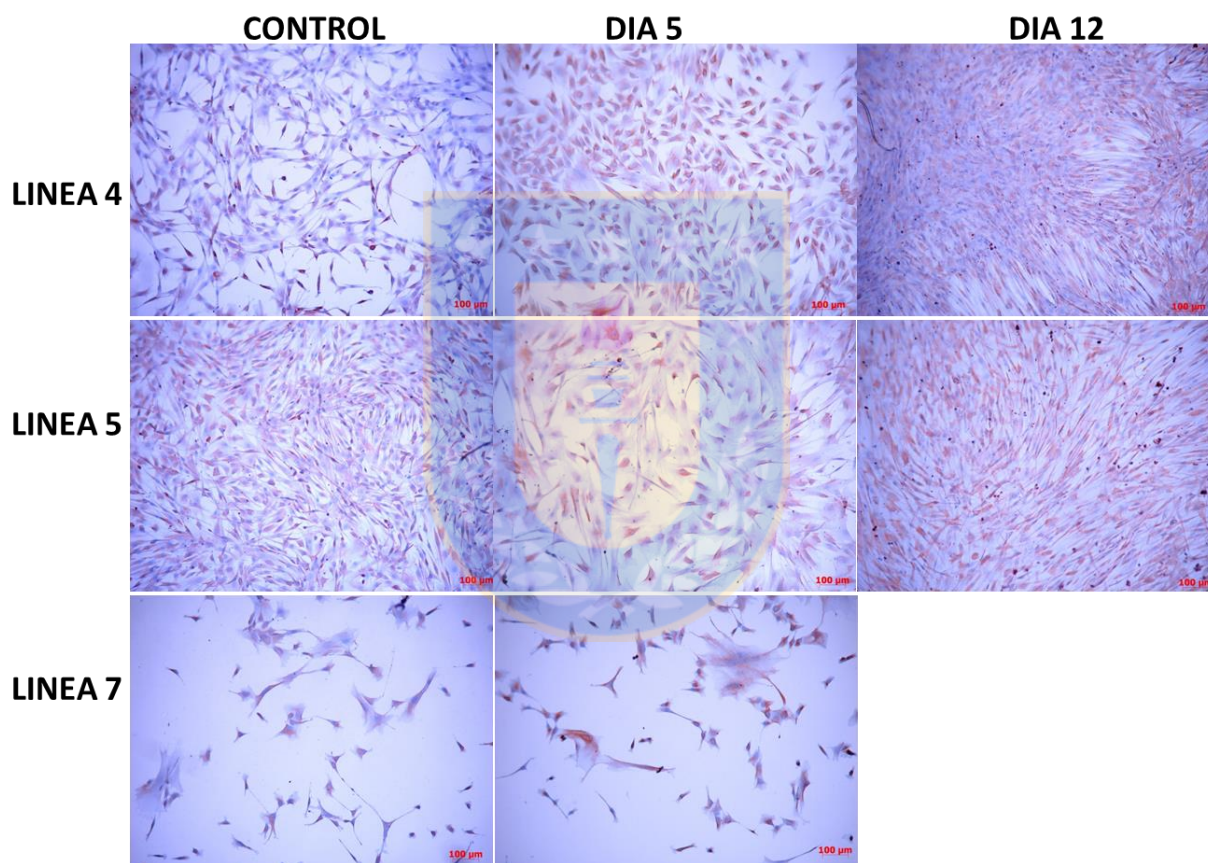
**Figura 17.** Ensayos de diferenciación a linajes mesodérmicos de los fibroblastos de gato doméstico bajo diferentes tratamientos de reprogramación. Línea 4 positiva para la tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. Fuente: Elaboración propia.

### *Inmunocitoquímica para expresión de vimentina en fibroblastos reprogramados con VPA+PRP*

Posterior a estos resultados se decidió evaluar la expresión de vimentina debido a que su expresión se relaciona principalmente con un fenotipo mesenquimal y con cambios en la reorganización del citoesqueleto durante procesos de diferenciación celular (Mendez et al., 2010). Adicionalmente, la expresión de la proteína vimentina se regula a la baja cuando las células adoptan características epiteliales y con el silenciamiento del gen SNAIL (Chaffer et al., 2006). Por una parte la expresión de mRNA de SNAIL en los fibroblastos tratados con VPA+PRP permaneció estable durante los diferentes días de reprogramación por lo que se esperaba encontrar también



una expresión positiva a vimentina. Adicionalmente se ha reportado que uno de los factores presentes en el PRP, el PDGF-B, puede inducir reorganización de actina y cambios morfológicos a nivel celular (Li et al., 2003). En el día 0 del tratamiento con las moléculas para la línea 4, la expresión de vimentina no fue tan marcada como en el día 5 y 12. Al día 5 del tratamiento con VPA+PRP se pueden observar algunas células con una morfología un poco más redondeada en comparación al día 0 (control) (Figura 18). Para la línea 5 la expresión de vimentina fue similar, tanto en el control como en los días 5 y 12 de tratamiento. Por su parte en la línea 7 la expresión de vimentina fue aparentemente más marcada en el día 5, sin embargo para el día 12 no fue posible evaluar la expresión debido a que las células entraron en senescencia y se desprendieron de la placa (Figura 18).

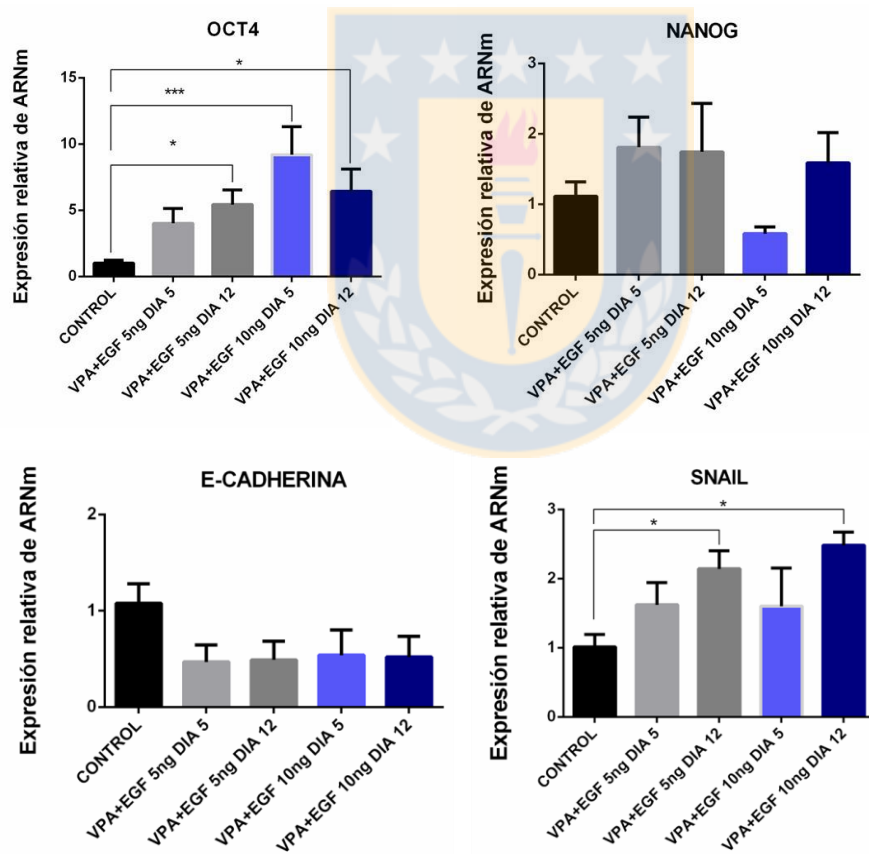


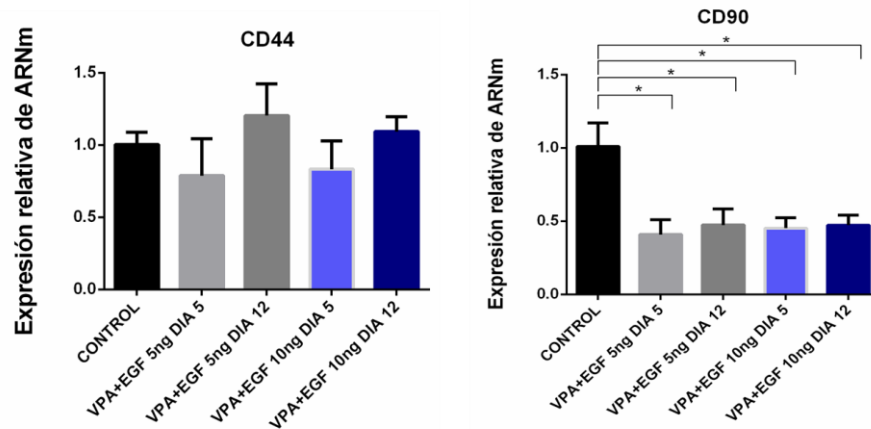
**Figura 18.** Inmunocitoquímica de vimentina para fibroblastos tratados con VPA+PRP. Se evaluó la expresión de vimentina en las líneas 4, 5 y 7 durante los días de tratamiento 0, 5 y 12 con VPA+PRP. En la línea 7 la imagen del día 12 no se documentó debido a desprendimiento de las células de la placa de cultivo. Fuente: Elaboración propia.

*Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con VPA+EGF*

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de diferenciación de las células tratadas con VPA+PRP se evaluó la misma molécula más un factor de crecimiento presente en el PRP, el EGF, para determinar si el efecto proliferativo del EGF y la expresión de receptores para EGF en fibroblastos mejoraba los resultados de reprogramación favoreciendo la expresión de genes de pluripotencia junto con el ácido valproico como remodelador epigenético. Se ensayaron dos concentraciones de EGF, 5 y 10 ng y se evaluó la expresión de OCT4, NANOG, CD90, CD44 frente a las dos concentraciones de EGF con VPA.

La expresión de OCT4 se detectó con la combinación de VPA + 5 y 10 ng/ml de EGF al día 12 de tratamiento. La expresión de NANOG no presentó diferencias en su expresión así como CD44. CD90 presentó una disminución en su expresión, mientras que la expresión de E-Cadherina no presentó diferencias, la expresión de SNAIL aumentó al día 12 del tratamiento con ambas concentraciones (Figura 19).



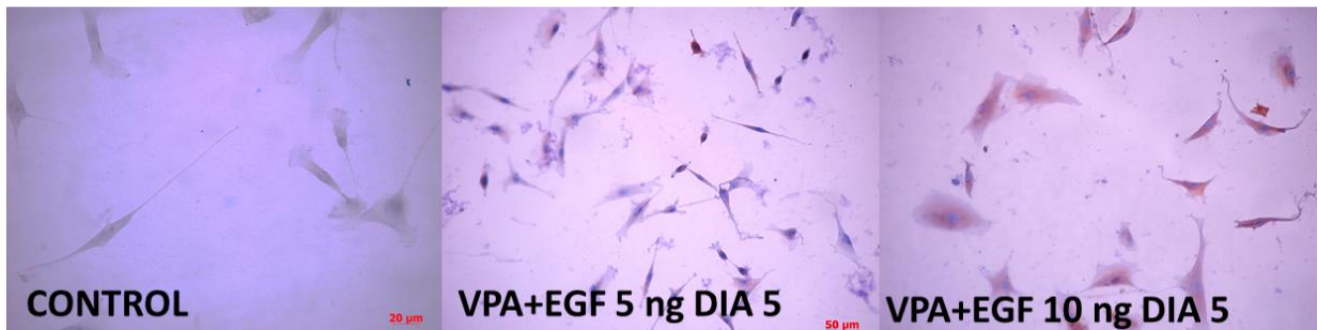


**Figura 19.** Expresión de OCT4, NANOG, CD44, CD90, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos de gato doméstico reprogramados con VPA+EGF (n=2). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05. Fuente: Elaboración propia.

#### *Inmunocitoquímica para expresión de Oct4 en fibroblastos tratados con VPA+EGF*

Para evaluar la expresión de Oct4 a nivel de proteína se realizó una inmunocitoquímica al día 5 de tratamiento con VPA+EGF. El grupo control no presentó positividad para Oct4, mientras que al día 5 con las dos concentraciones de EGF hubo positividad para esta proteína, siendo mucho más intensa con la dosis de 10 ng/ml de EGF en combinación con VPA. La expresión se observó principalmente a nivel citoplasmático y perinuclear (Figura 20).

### INMUNOCITOQUIMICA OCT4

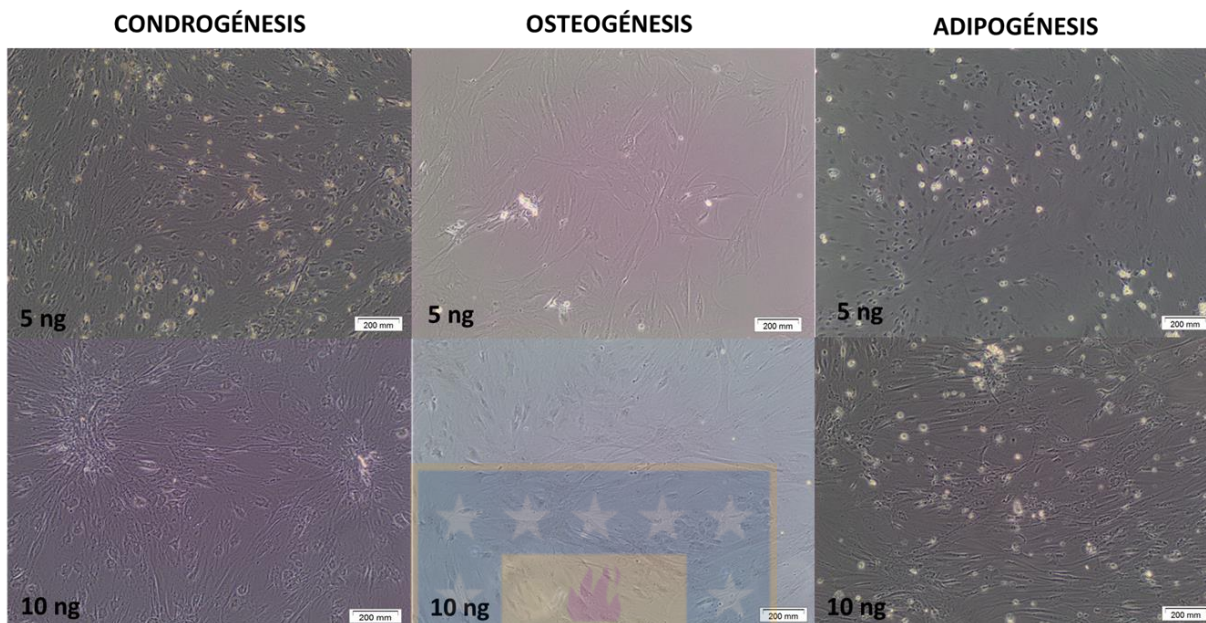


**Figura 20.** Evaluación de la expresión de Oct4 por medio de inmunocitoquímica en fibroblastos dérmicos de gato reprogramados con VPA+EGF. Fuente: Elaboración propia.



### Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con VPA+EGF

Ninguna de las líneas tratadas con VPA+EGF (5 y 10 ng) presentó cambios morfológicos o tinción que diera indicio de diferenciación hacia algún linaje específico (Figura 21).



**Figura 21.** Ensayos de diferenciación mesodérmica con fibroblastos de gato doméstico reprogramados con VPA+EGF. Ninguna de las líneas presentó positividad a las tinciones para diferenciación condrogénica (azul de alcian), osteogénica (rojo alizarina) y adipogénica (Oil Red). Fuente: Elaboración propia.

Con los tratamientos empleados en estos experimentos se obtuvieron resultados parciales de reprogramación de fibroblastos hacia células madre mesenquimales inducidas (iMSC). Con el tratamiento de VPA+PRP se detectó expresión de Oct4 evaluada por inmunocitoquímica y una población celular de esas células reprogramadas que respondió a los tratamientos de diferenciación mesodérmica (adipogénesis, condrogénesis y osteogénesis). Al evaluar el ácido valproico con un factor de crecimiento presente en el PRP, EGF, se detectó la expresión de los genes master de pluripotencia OCT4 y NANOG pero los ensayos de diferenciación mesodérmica resultaron negativos. Con vistas a evaluar el papel de otro factor específico presente en el PRP, se decidió emplear h-PDGF-B. No había disponibilidad comercial del mismo por lo que se decidió clonar y expresar el gen para purificar la proteína en un sistema heterólogo (Figura 3).

La positividad de las muestras 1 y 2 (Figura 3) denota la presencia de proteínas con cola de histidina secretadas al medio por las células SIHA. El círculo 3 en la imagen representa el concentrado del sobrenadante sin SFB pasado por AMICON 50 y 10, dónde se encontraban proteínas con cola de histidina con un rango de peso similar a la proteína recombinante h-PDGF-B (15 kDa). Las muestras 4 y 5 corresponden a los concentrados obtenidos de los filtros AMICON que fueron pasados posteriormente por la columna de afinidad para atrapar proteínas con cola de

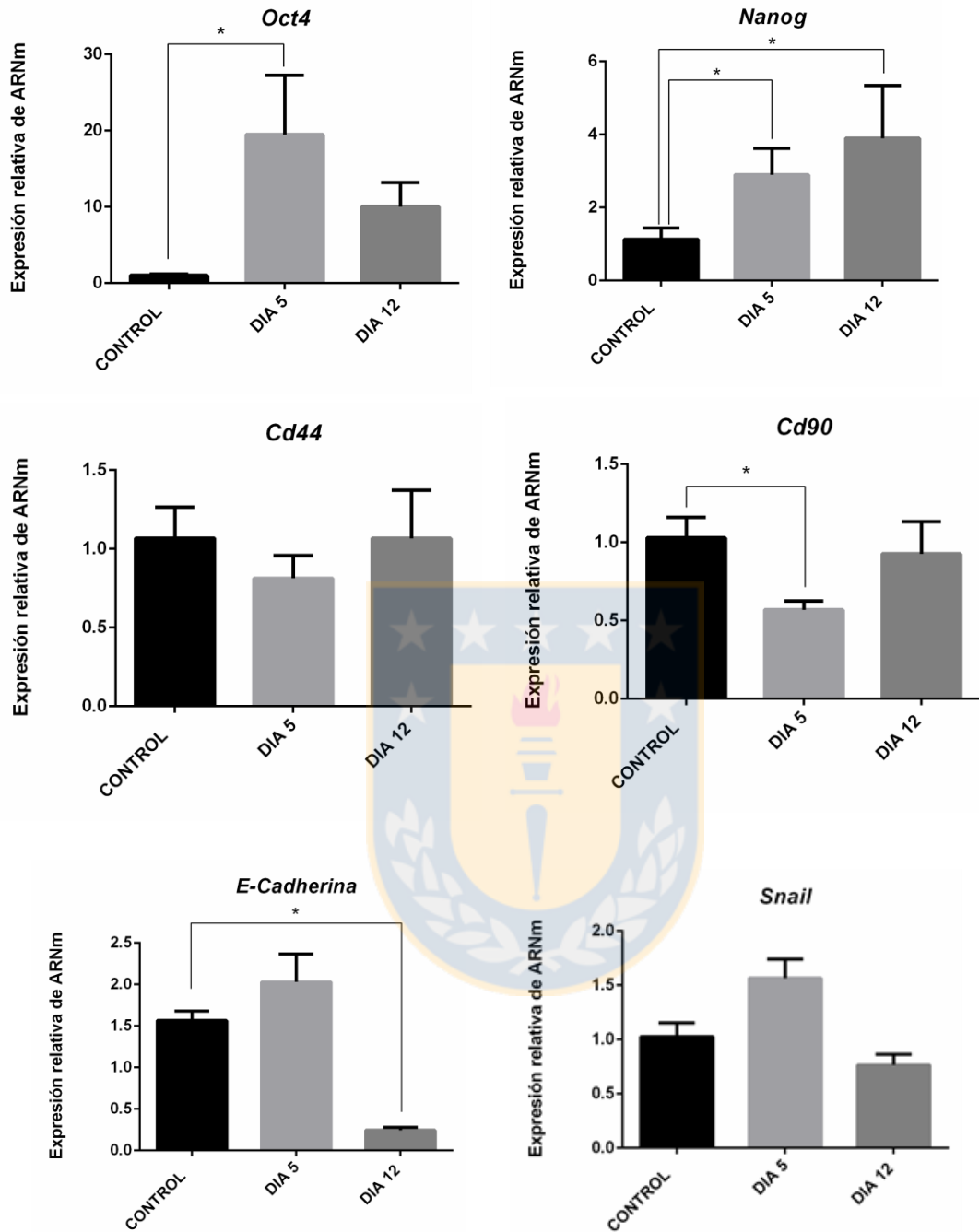
histidina (Figura 3). Posteriormente las fracciones 4 y 5 fueron cuantificadas para su posterior uso en el coctel de reprogramación y ensayos de actividad biológica. Como control negativo de la técnica se empleó sólo medio de cultivo, el cual se no mostró reacción (Imagen no mostrada).

En el ensayo de actividad biológica del h-PDGF-B el porcentaje de células que entraron en fase G0/G1 fue significativamente mayor en el grupo que contenía solo 0,5% de SFB a las 48 horas en comparación con los otros tratamientos. Por otro lado, el grupo que se mantuvo en medio 0,5% de SFB + h-PDGF-B presentó un mayor porcentaje de células que entraron en fase G2/M que el grupo con el mismo porcentaje de suero pero sin h-PDGF a las 96 horas. Las células que se encontraban con el tratamiento de 0,5% de SFB por 96 horas tuvieron un porcentaje menor en G2/M y S comparado con los otros tratamientos y también un porcentaje mayor de apoptosis (Figura 4). Juntos estos resultados indican que la concentración empleada de h-PDGF-B en el medio de cultivo ejerce un efecto biológico sobre la proliferación de los fibroblastos al comportarse muy similar al efecto de los otros medios que contenían 10% SFB.

Se evaluó en primera instancia el tratamiento de VPA+h-PDGF-B para determinar si los resultados obtenidos podían mejorar con respecto al tratamiento con VPA+PRP al emplear un solo factor de crecimiento partiendo de la hipótesis de que el uso del PRP pudo interferir en una inducción eficiente hacia multipotencia. También se plantea la hipótesis de que el uso del h-PDGF-B con un remodelador epigenético, independiente de que sea VPA o 5-AZA, mejora el nivel de plasticidad de los fibroblastos felinos, por lo que se decide evaluar una de las combinaciones anteriores con 5-AZA reemplazando el PRP por h-PDGF-B y adicionando VITC para prevenir senescencia celular y A8301 como bloqueador de la vía de señalización TGF- $\beta$  que media la diferenciación celular. El efecto del VPA en la inducción de la expresión de genes de pluripotencia en el tratamiento con VPA+EGF y diferenciación mesodérmica con VPA+PRP se había logrado pero se desconoce si 5-AZA puede tener el mismo efecto.

#### *Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con VPA + h-PDGF-B*

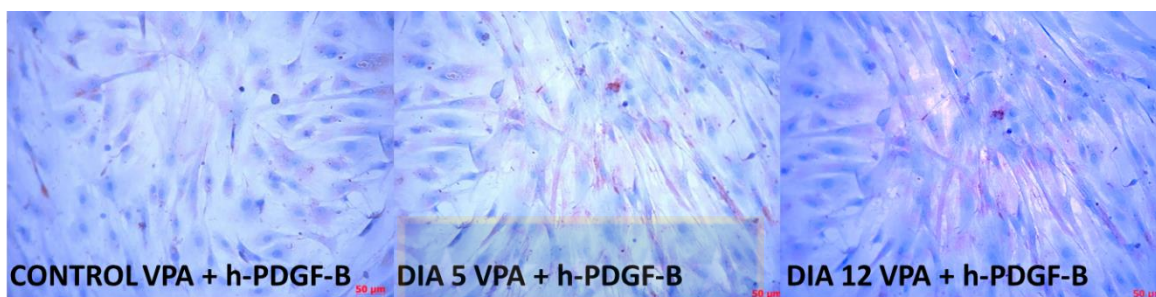
La expresión de los genes de pluripotencia OCT4 y NANOG se detectó desde el día 5 de tratamiento con VPA+ h-PDGF-B. La expresión de OCT4 fue significativamente mayor al día 5 y luego disminuyó nuevamente al día 12, mientras que la expresión de NANOG incrementó desde el día 5 de tratamiento. Por su parte la expresión de E-Cadherina, SNAIL y el marcador de superficie CD44 no presentaron diferencias estadísticas significativas en su expresión. La expresión del marcador de superficie CD90 disminuyó al día 5 de tratamiento pero posteriormente su expresión al día 12 fue similar al grupo control (día 0) (Figura 22). Similar a los otros tratamientos, se ha encontrado que la expresión de CD44 no varía mucho, mientras que la expresión de CD90 tiende a disminuir con respecto al control, lo que podría indicar que tal vez la expresión de estos marcadores no se ve afectada significativamente con los diferentes tratamientos y que tal vez no sean buenos indicadores de inducción de fibroblastos a iMSC.



**Figura 22.** Expresión de genes OCT4, NANOG y marcadores de superficie para fibroblastos tratados con VPA+ h-PDGF-B. (n=1). Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05. Fuente: Elaboración propia.

### *Inmunocitoquímica para expresión de Oct4 en fibroblastos tratados con VPA + h-PDGF-B*

Para evaluar la expresión de Oct4 a nivel de proteína se realizó una inmunocitoquímica al día 5 y 12 de tratamiento con VPA+ h-PDGF-B. El grupo control presentó una leve positividad para Oct4 a nivel citoplasmático, al día5 de tratamiento la expresión fue muy similar al del grupo control, pero para el día 12 la expresión a nivel citoplasmático y perinuclear de Oct4 era más marcada (Figura 23).

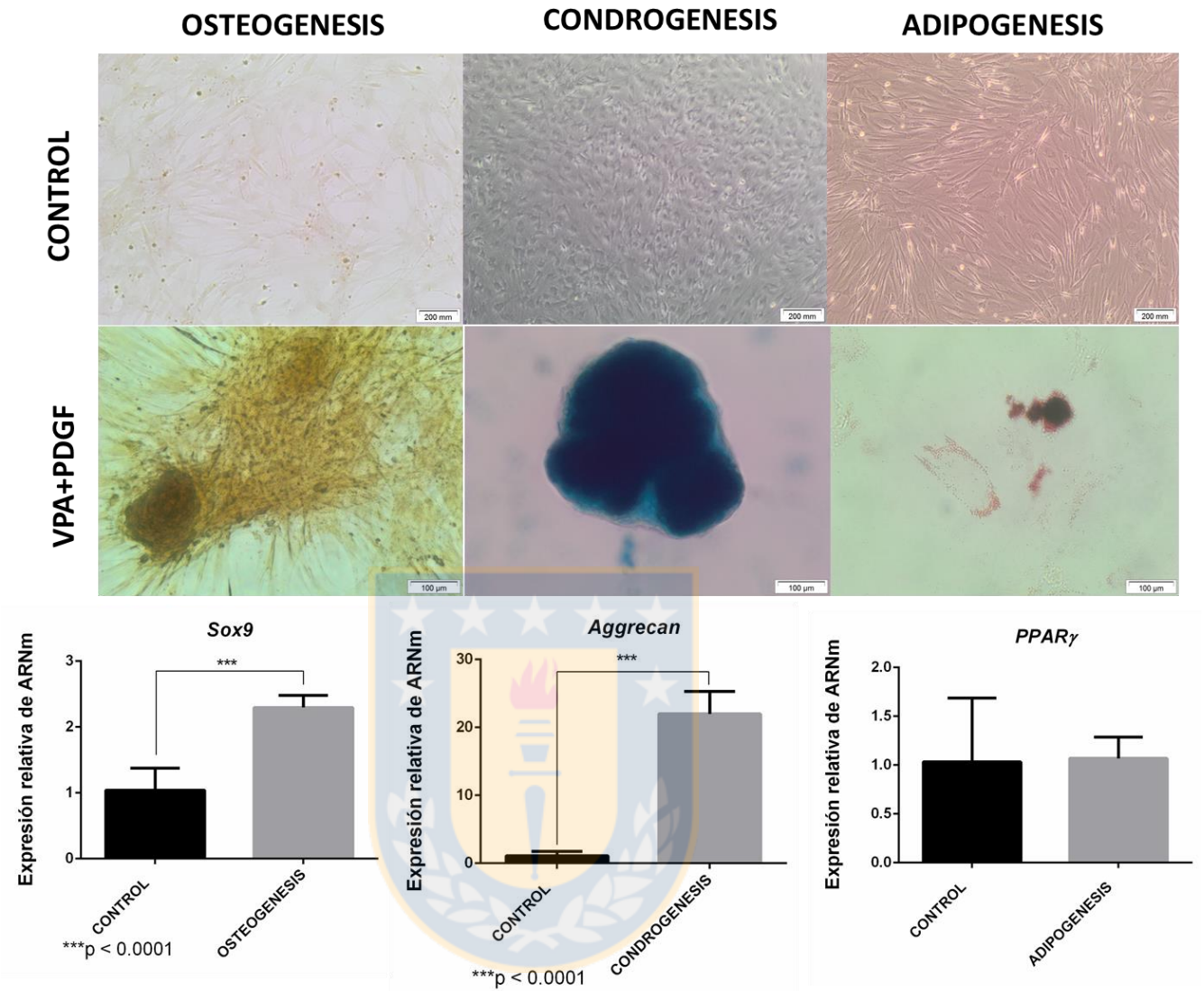


**Figura 23.** Inmunocitoquímica para evaluar expresión de Oct4 en fibroblastos reprogramados con VPA+h-PDGF-B. Fuente: Elaboración propia.

### *Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con VPA+h-PDGF-B*

Para evaluar la plasticidad de los fibroblastos frente al tratamiento con VPA + h-PDGF-B, se sometieron a ensayos de diferenciación mesodérmica una vez completados los 12 días de reprogramación. Los fibroblastos reprogramados presentaron capacidad de diferenciación mesodérmica. La expresión de Sox9 fue significativamente mayor en comparación con las células que no fueron sometidas a diferenciación osteogénica (Figura 24). Las células reprogramadas y diferenciadas a condrocitos tuvieron la capacidad de formar pellets y fueron positivas para la tinción con Alcian blue, adicionalmente la expresión de Aggrecan fue significativamente mayor que en el grupo control (Figura 24). Por su parte, los fibroblastos reprogramados hacia linaje adipogénico presentaron algunos grupos celulares que respondieron al medio de diferenciación con la formación de vacuolas lipídicas teñidas con Oil Red aunque no se encontró diferencias en la expresión del gen PPAR $\gamma$  respecto al grupo no diferenciado (Figura 24).





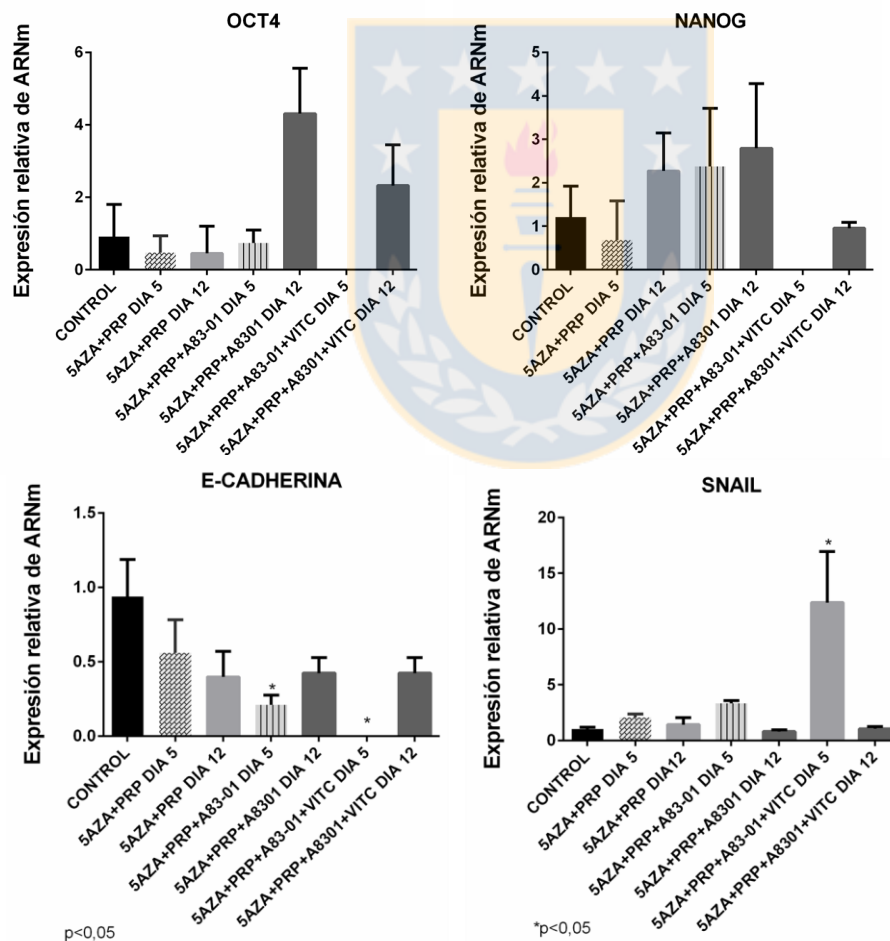
**Figura 24.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con VPA + h-PDGF-B y expresión de genes Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$ . Tinción positiva con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . Fuente: Elaboración propia.

De este tratamiento se puede concluir que se logró detectar la expresión de OCT4 y NANOG y que los fibroblastos inducidos presentaron capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos.

## Reprogramación de fibroblastos empleando 5-Azacidina (5-AZA) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP) como factor de crecimiento y h-PDGF-B

*Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos felinos reprogramados con 5-AZA + PRP*

Los fibroblastos felinos fueron sometidos a tratamiento empleando como remodelador epigenético 5-AZA y PRP como principales componentes de los medios de reprogramación. A los tratamientos se les adicionó un inhibidor del vía TGF- $\beta$  (A8301) y Vitamina C. Con estos tratamientos no se detectó expresión significativa de los genes de pluripotencia OCT4 y NANOG. Respecto a la expresión de E-Cadherina se observó una disminución significativa entre el tratamiento 5AZA+PRP+A8301+VITC al día 5 y el control mientras la expresión del gen SNAIL, relacionado con células altamente diferenciadas, presentó una mayor expresión en los fibroblastos bajo el tratamiento con 5AZA+PRP+A8301+VITC al día 5 (Figura 25).

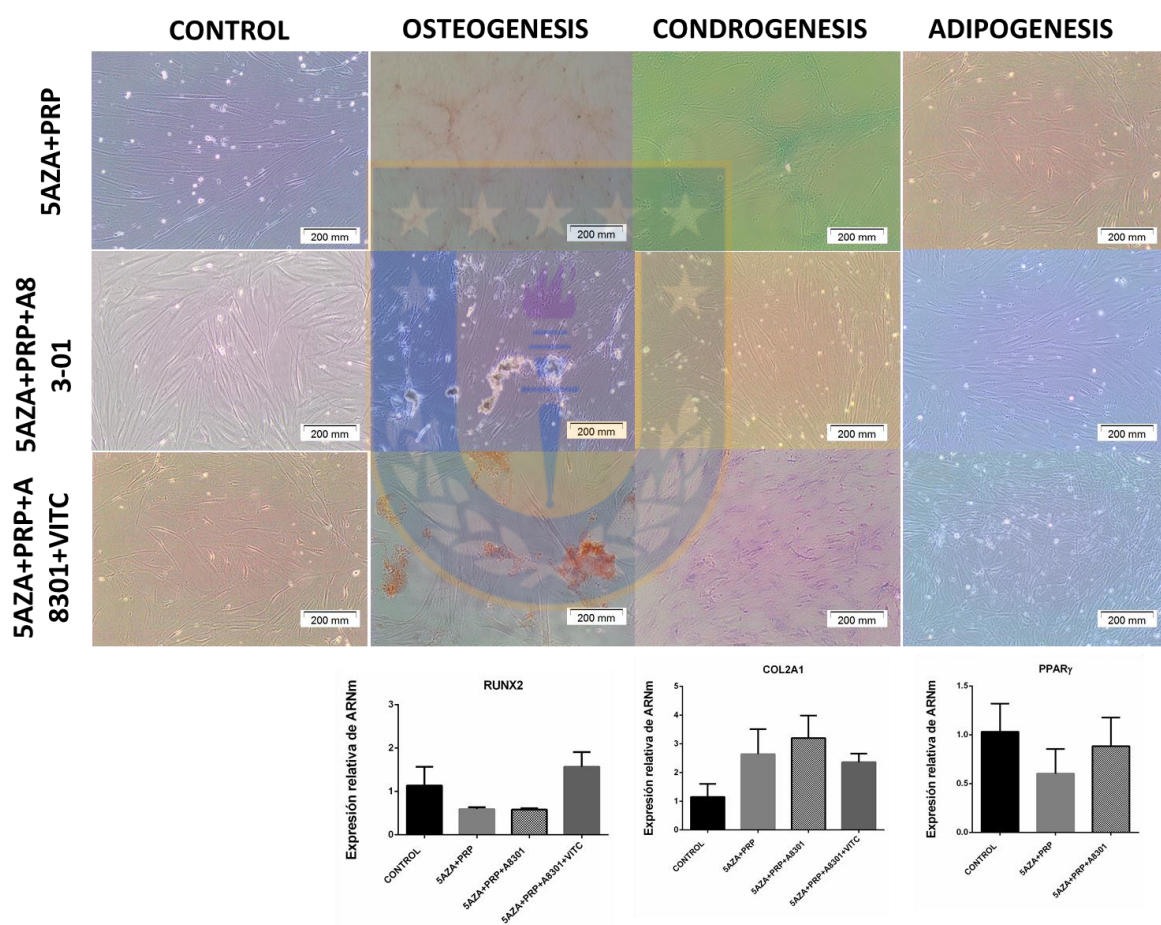


**Figura 25.** Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos felinos bajo tratamiento con 5-AZA + PRP. El test de Kruskal Wallis fue empleado para evaluar diferencias entre

los grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ .  
Fuente: Elaboración propia.

### Ensayos de diferenciación mesodérmica en fibroblastos felinos tratados con 5-AZA + PRP

Para evaluar si alguno de estos tratamientos tenía efecto sobre la plasticidad de los fibroblastos felinos y una posterior capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos, las células sometidas a reprogramación fueron posteriormente cultivadas en medios de diferenciación específicos para estos linajes. Los fibroblastos sometidos a los tratamientos no presentaron ninguna respuesta en cambios morfológicos o tinciones especiales (Figura 26).

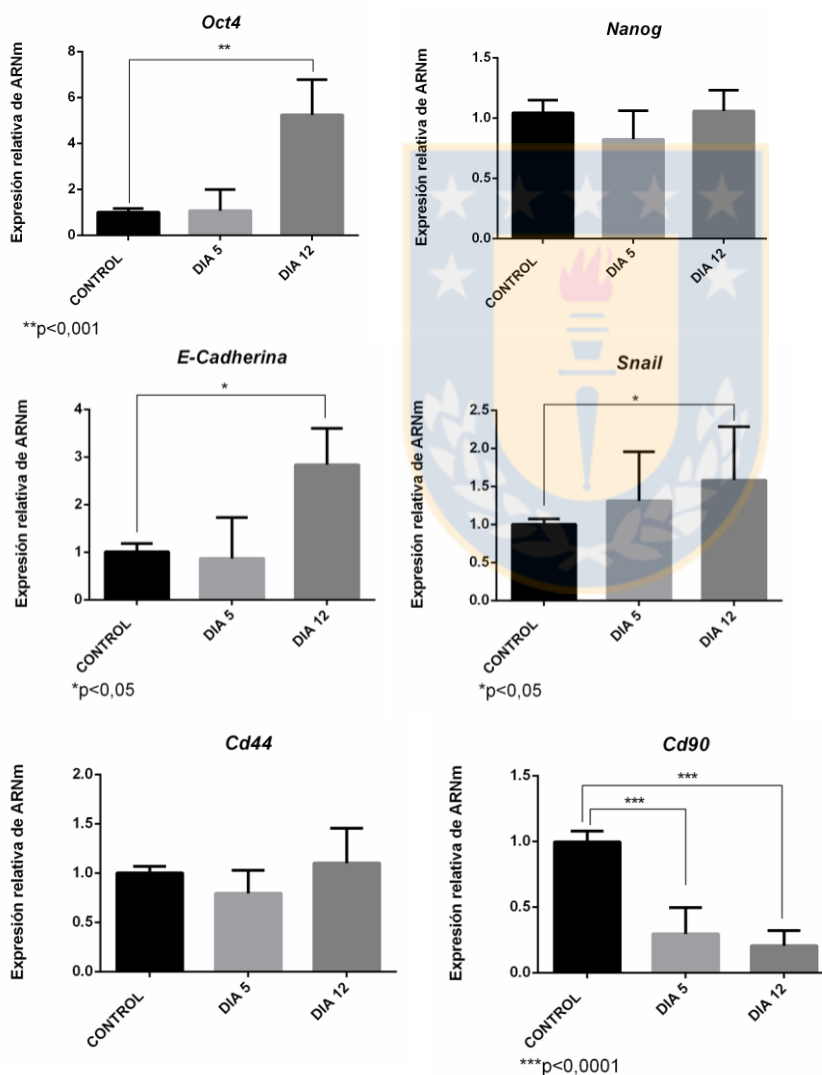


**Figura 26.** Ensayos de diferenciación mesodérmica en fibroblastos felinos reprogramados con 5-AZA+PRP. Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba de Kruskal Wallis fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Fuente: Elaboración propia.



### Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos reprogramados con 5-AZA + h-PDGF-B

Para evaluar la plasticidad de fibroblastos de gato doméstico bajo el protocolo de inducción a multipotencia con 5-azacitidina y h-PDGF-B se emplearon 4 líneas celulares, las cuales fueron evaluadas para determinar la respuesta frente a los factores de reprogramación. Respecto a la expresión de genes de pluripotencia, la expresión de OCT4 y E-Cadherina al día 12 de tratamiento fue significativamente mayor. La expresión de Nanog no presentó diferencias durante los días de tratamiento. Por su parte la expresión de SNAIL aumentó también al día 12 de la reprogramación. La expresión de marcadores de superficie, CD44 y CD90, esta fue similar a los otros tratamientos, dónde la expresión de CD44 no presentó diferencias estadísticas pero la expresión de CD90 disminuye con los tratamientos de reprogramación (Figura 27).



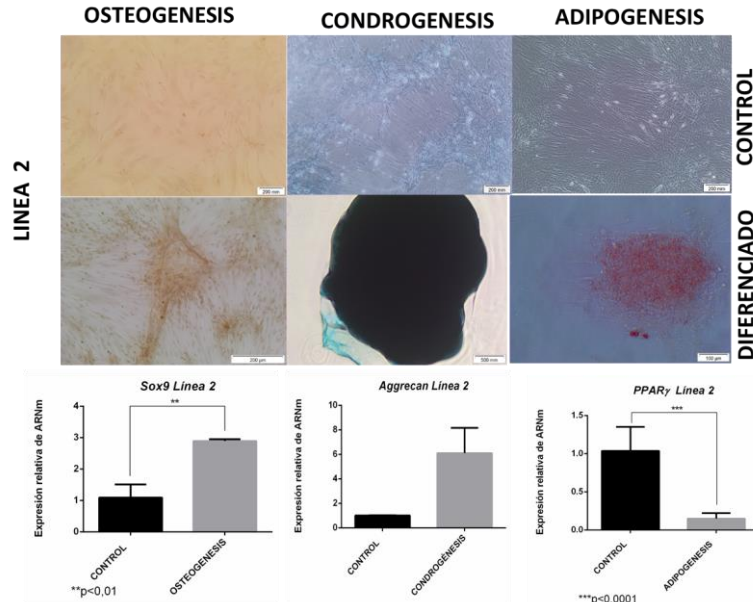
**Figura 27.** Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie para fibroblastos tratados con 5-AZA + h-PDGF-B. La prueba de Kruskal Wallis fue empleada para determinar

diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia.

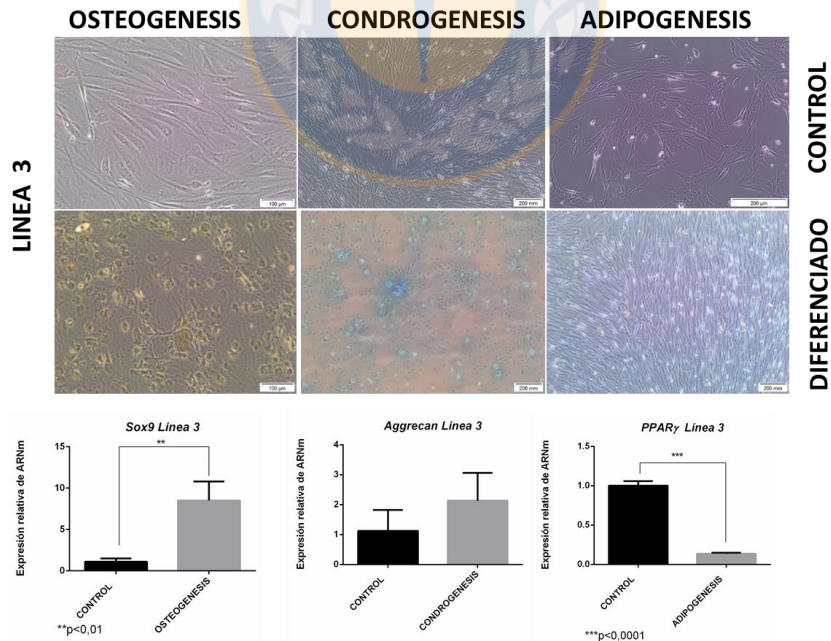
#### *Ensayos de diferenciación mesodérmica para fibroblastos tratados con 5-AZA + h-PDGF-B*

Las 4 líneas de fibroblastos reprogramadas con 5-AZA + h-PDGF-B suplementado con Vitamina C y A8301 posteriormente fueron sometidas a ensayos de diferenciación mesodérmica. Al evaluar la respuesta de las células en los diferentes medios de diferenciación por medio de tinción, tres de las líneas inducidas presentaron cambios morfológicos o positividad a las tinciones. La línea 3 sin embargo solo presentó cambios morfológicos menores (células un poco más esferoides en los medios de diferenciación osteogénico y condrogénico) y fueron negativas a las tinciones de rojo alizarina y alcian blue respectivamente. En esta línea no hubo diferenciación adipogénica (Figura 29). Respecto a la expresión de genes relacionados con diferenciación osteogénica, la línea 3 presentó un incremento estadísticamente significativo en la expresión de Sox9 (Figura 29), y para la diferenciación condrogénica no presentó diferencias en la expresión de Aggrecan (Figura 29), así mismo la expresión de PPAR $\gamma$  disminuyó significativamente en esta línea sometida a diferenciación adipogénica. Por su parte, la línea celular 2 presentó respuesta positiva a la tinción con rojo alizarina y una expresión significativamente mayor de Sox9. El pellet formado por estas células reprogramadas fue de gran tamaño y fue positivo para la tinción con Alcian Blue aunque la expresión de Aggrecan no presentó diferencias estadísticas (Figura 28). Sin embargo, aunque se evidenciaron algunos cambios en grupos celulares aislados hacia diferenciación adipogénica, la expresión de PPAR $\gamma$  disminuyó significativamente con respecto al grupo control (Figura 28).

Respecto a las líneas celulares 4 y 6, ambas presentaron tinciones positivas para rojo alizarina aunque para la línea 4 la expresión de Sox9 fue significativamente menor respecto al control y para la línea 6 la expresión de este mismo gen aumentó significativamente. Ambas líneas también presentaron una tinción positiva para Alcian blue en la diferenciación condrogénica; sin embargo, la expresión de Aggrecan no presentó cambios en su expresión en ninguna de las dos líneas (Figuras 30 y 31). Para la diferenciación adipogénica la línea 4 tampoco presentó cambios visibles en su morfología indicativos aunque la expresión de PPAR $\gamma$  aumentó significativamente. Por su parte, la línea 6 tuvo una diferenciación adipogénica muy marcada, con formación de vacuolas lipídicas de gran tamaño y tinción positiva para oil red, adicionalmente la expresión de PPAR $\gamma$  fue significativamente mayor que en el grupo control (Figura 31).

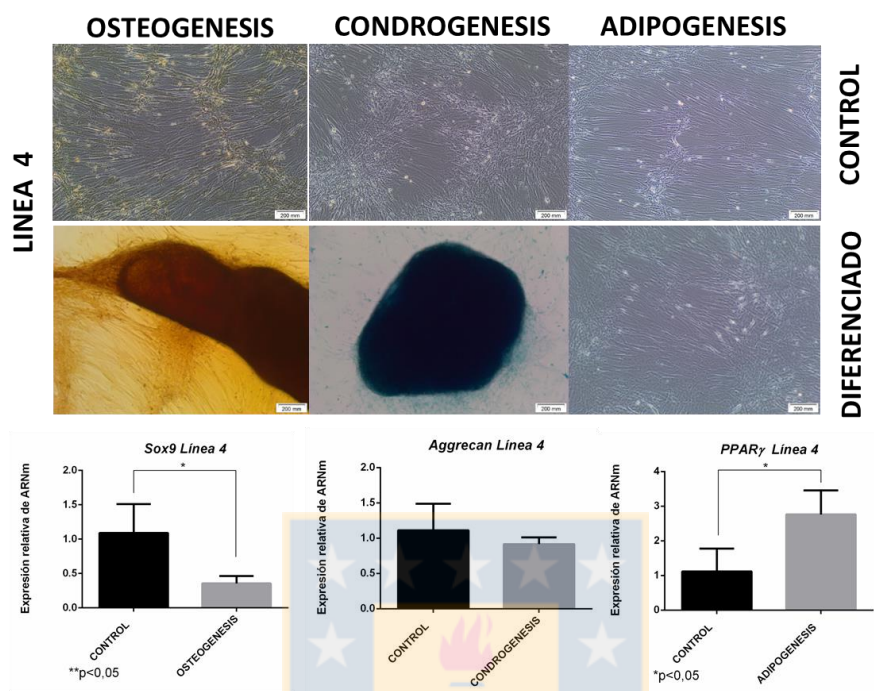


**Figura 28.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 2). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia.

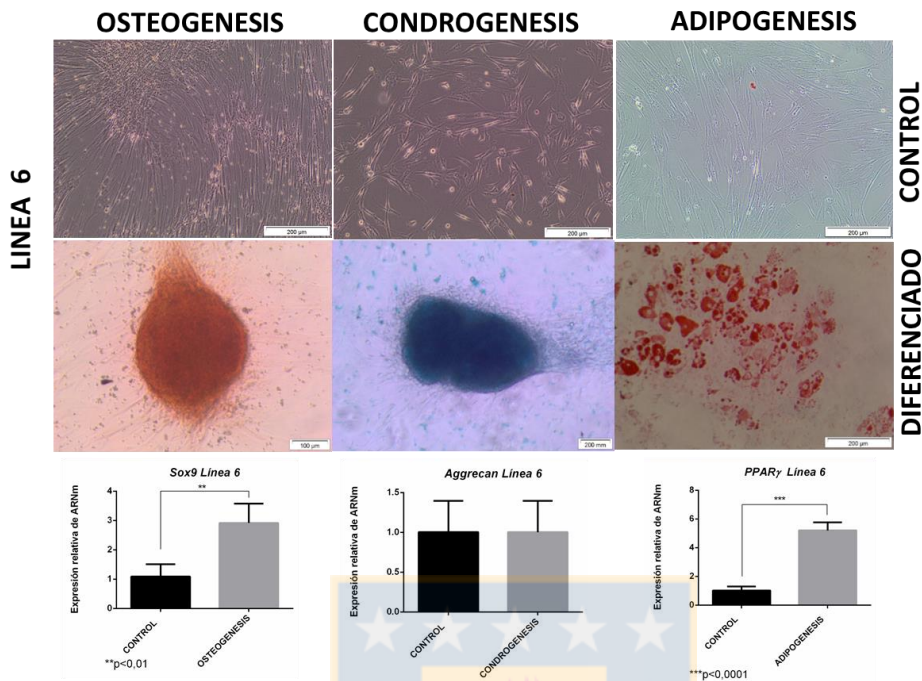


**Figura 29.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 3). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue

empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia.



**Figura 30.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 4). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fuente: Elaboración propia.



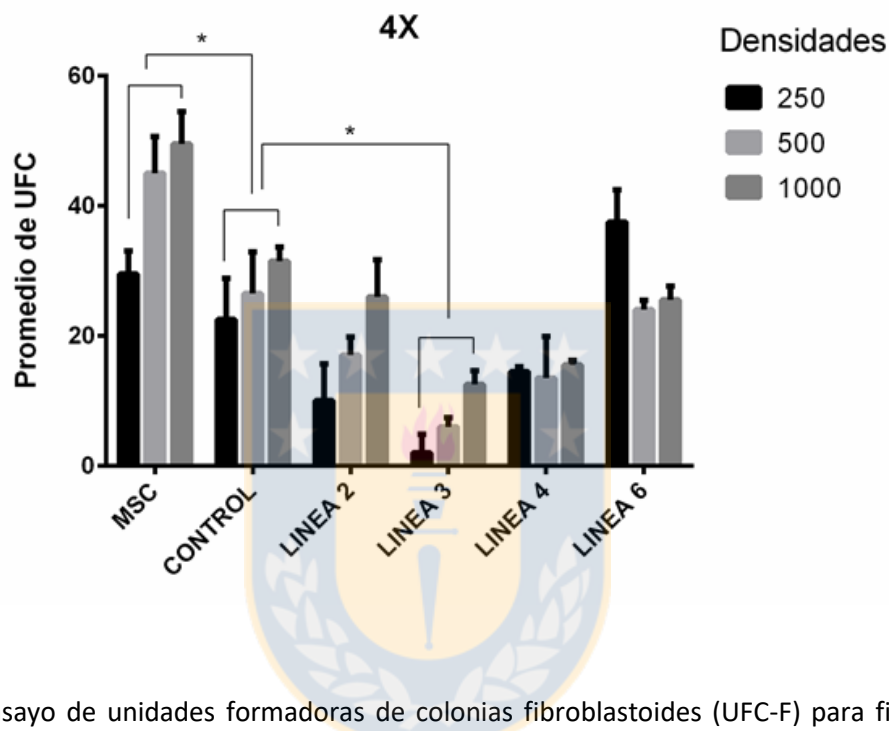
**Figura 31.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y qRT-PCR de la expresión de Sox9, Aggrecan y PPAR $\gamma$  para cada línea diferenciada (Línea 6). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia.

#### *Ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC) para líneas de fibroblastos reprogramadas con 5-AZA + h-PDGF-B*

Posterior a los tratamientos de inducción a multipotencia con 5-AZA + h-PDGF-B para los fibroblastos se decidió evaluar la capacidad de clonogenicidad de estas células una vez reprogramadas. Se hizo un ensayo de formación de colonias junto con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSC) y fibroblastos sin reprogramar. En este ensayo se encontró que existe una marcada diferencia significativa entre el número de colonias formadas a diferentes densidades de siembra entre AMSC y las diferentes líneas reprogramadas, así como entre fibroblastos sin reprogramar y fibroblastos bajo tratamiento. Se observó que el tratamiento con 5-AZA + h-PDGF-B afectaba negativamente el número de unidades formadoras de colonias en la línea 3 al compararse con el grupo control, las otras líneas presentaron capacidad de formación



de colonias similar a los fibroblastos sin inducir a multipotencia, sin embargo, el promedio de UFC fue menor para todos los fibroblastos al compararse con las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Figura 32).



**Figura 32.** Ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblastoides (UFC-F) para fibroblastos tratados con 4 factores. Las células fueron sembradas a 250, 500 y 1000 células/cm<sup>2</sup>. Un ANOVA de dos vías fue empleado para evaluar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

En esta primera sección se cumplió con el objetivo de caracterizar la expresión de genes relacionados con la pluripotencia y marcadores de superficie en fibroblastos, obteniendo positividad para la expresión de ARNm para OCT4, NANOG y CD44. Esta expresión se comparó entre fibroblastos y AMSCs felinas, dónde la expresión de OCT4, NANOG y CD90 fue mayor en AMSCs que en fibroblastos, mientras que la expresión de CD44 fue mayor para los fibroblastos. Adicionalmente, se evaluaron varios protocolos de inducción a multipotencia. Para esto se realizaron varios experimentos con el uso de remodeladores epigenéticos (VPA/5-AZA) y factores de crecimiento (Plasma Rico en Plaquetas – PRP, EGF y h-PDGF-B). La evaluación de la expresión de marcadores de superficie fue negativa por citometría de flujo probablemente por baja afinidad de los anticuerpos detectándose sólo un bajo porcentaje de expresión de CD90 en fibroblastos tratados al día 5 y 12 con VPA+PRP, razón por la cual la expresión de marcadores de superficie no

se continuó evaluando por esta técnica. En la tabla resumen se detallan los resultados obtenidos con el uso de los dos remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento.

**Tabla 9.** Resumen de resultados de inducción a multipotencia de fibroblastos felinos con ácido valproico, 5-Azacitidina y factores de crecimiento.

	TRATAMIENTO	EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE	EXPRESIÓN DE GENES DE MULTIPOTENCIA	DIFERENCIACIÓN MESODÉRMICA
<b>ACIDO VALPROICO</b>	<b>VPA+PRP</b>	No diferencias en la expresión de ARNm, CD90 aumentó su % por citometría de flujo	No diferencias en la expresión	<b>OSTEO-CONDRO-ADIPO</b>
	<b>VPA + h-PDGF-B</b>	CD90 disminuye al día 5	OCT4, NANOG	<b>OSTEO-CONDRO-ADIPO</b>
	<b>VPA+EGF</b>	CD90 disminuye	OCT4, NANOG, SNAIL	<b>NO DIFERENCIADO</b>
<b>5-AZACITIDINA</b>	<b>5 AZA + PRP</b>	No evaluado	No diferencias en la expresión	<b>CONDRO</b>
	<b>5 AZA + PRP + A8301</b>	No evaluado	No diferencias en la expresión	<b>NO DIFERENCIADO</b>
	<b>5-AZA + Vitamina C + A8301 + PRP</b>	No evaluado	No diferencias en la expresión	<b>NO DIFERENCIADO</b>
	<b>5-AZA + Vitamina C + A8301 + h-PDGF-B</b>	CD90 disminuye	OCT4, E-Cadherina	<b>OSTEO-CONDRO-ADIPO</b>

Fuente: Elaboración propia.



## Reprogramación de AMSC con remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento

Una vez concluidos los experimentos de reprogramación de fibroblastos y tomando en cuenta los resultados de esta etapa experimental, se ensayó la reprogramación en células madre mesenquimales de origen adiposo. Para esto se escogió un tratamiento con cada uno de los remodeladores epigenéticos (VPA o 5-AZA) y una molécula auxiliadora. En este experimento, las AMSC fueron cultivadas en medios suplementados con moléculas reprogramadoras (VPA + A8301 y 5-AZA + h-PDGF-B) con la finalidad de evaluar si estos componentes podían mejorar las características multipotentes de las células respecto a capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos o una mayor expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie. Para esto se emplearon dos tratamientos diferentes (Tabla 10). El primer tratamiento (VPA+A8301) se realizó en tres líneas celulares de gato doméstico, sin embargo, para el segundo tratamiento (5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B) una de estas líneas entró en senescencia. Así mismo, no fue posible evaluar los tratamientos en las AMSC de güiña ya que se poseía sólo una línea celular y sólo fue viable hasta el pase 5.

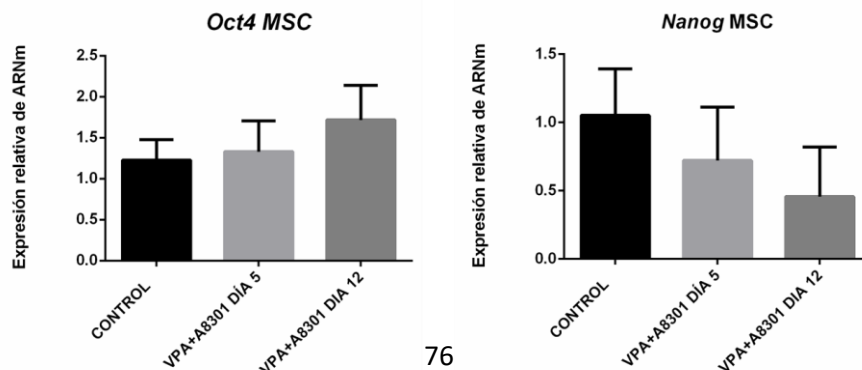
**Tabla 10.** Tratamientos de reprogramación empleados en AMSCs de gato.

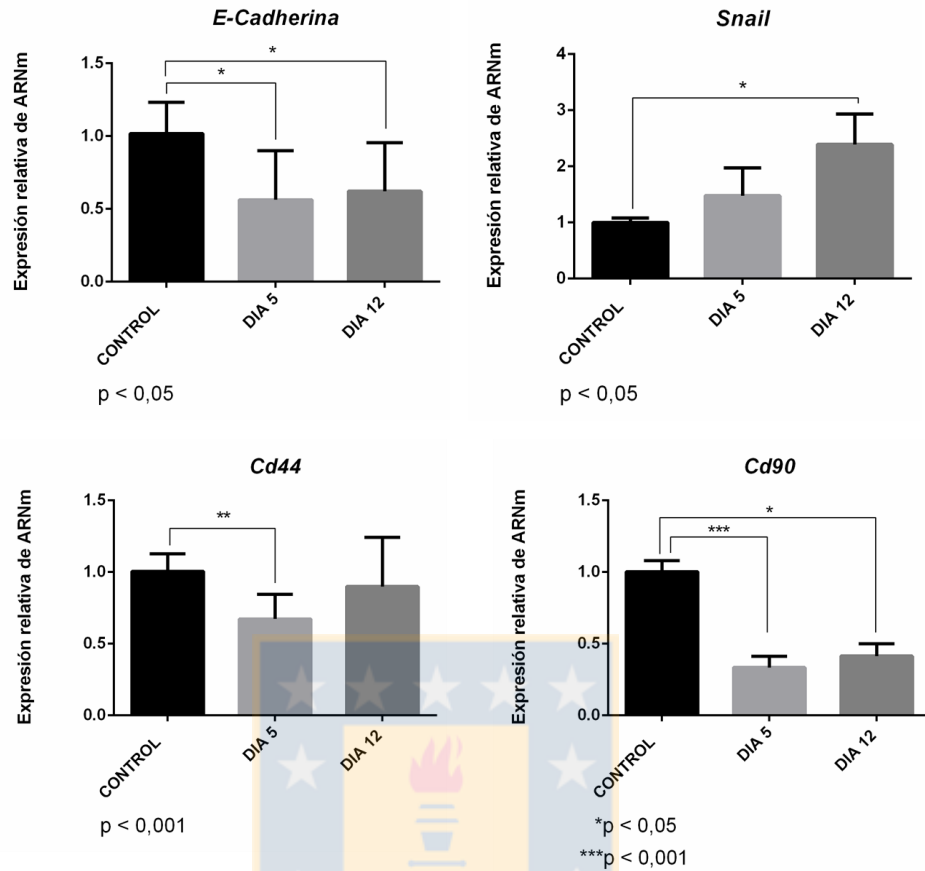
COMBINACIÓN	DOSIS DE CADA COMPONENTE
VPA + A8301	1mM + 0.25 mM
5-AZA + Vitamina C + A8301 + PDGF	10 $\mu$ M + 1mM + 0.25 mM + 100 ng/ml
Medio MSC estándar	Estándar

Fuente: Elaboración propia.

### *Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie en AMSC tratadas con VPA+A8301*

La expresión de genes de pluripotencia fue evaluada en AMSC reprogramadas con VPA+A8301. Este tratamiento se instauró con la finalidad de favorecer la expresión de genes de pluripotencia con el uso del VPA y favorecer el estado indiferenciado al bloquear la vía de señalización de TGF- $\beta$  con la molécula A8301. Al evaluarse en conjunto todas las líneas celulares, no se observó diferencias significativas en la expresión de OCT4, NANOG, E-cadherina y SNAIL. La expresión de CD44 se vio significativamente disminuida al día 12 del tratamiento y similar fue para CD90, expresión que disminuyó significativamente desde el día 5 y que coincide con el patrón de expresión de este mismo marcador en fibroblastos reprogramados. La expresión de MHCII disminuyó significativamente al día 5 (Figura 33).

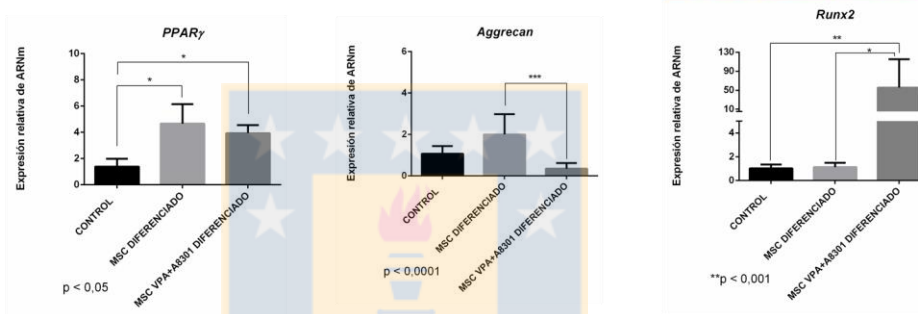
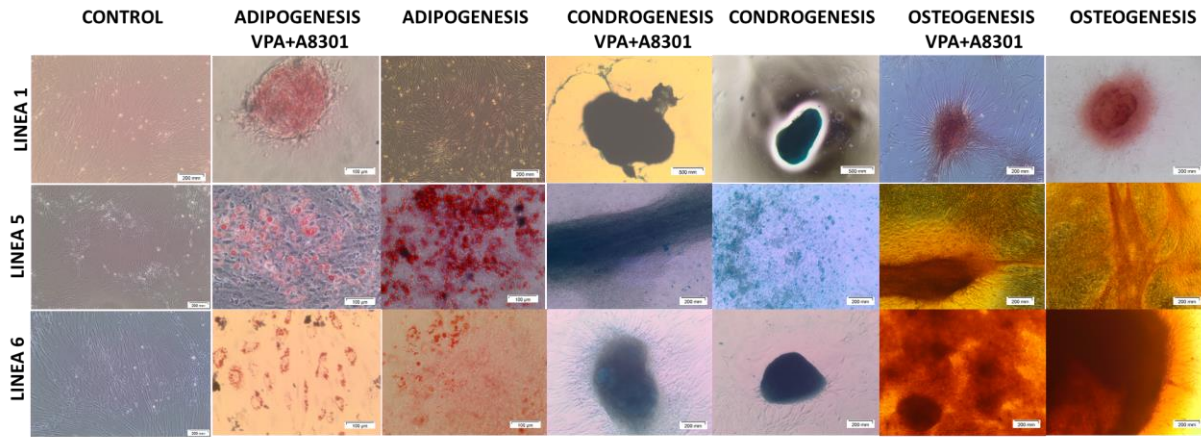




**Figura 33.** Expresión de OCT4, NANOG, E-Cadherina, SNAIL, CD44 y CD90 en las diferentes líneas AMSC de gato doméstico reprogramadas con VPA+A8301 (n=2). La prueba de Kruskal Wallis fue empleada para determinar diferencias entre grupos (n = 3). Todos los datos son presentados como promedio ± desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*\*p<0,0001. Fuente: Elaboración propia.

#### Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSCs reprogramadas con VPA+A8301

Para evaluar si el tratamiento con VPA+A8301 mejoraba la capacidad de diferenciación de las AMSC, estas se sometieron a ensayos de diferenciación junto con las AMSCs de la misma línea sin reprogramar. En todas las líneas se observó capacidad de diferenciación hacia los tres linajes mesodérmicos con excepción de la línea 1, en la cual no hubo diferenciación adipogénica en las AMSC sin reprogramar, pero sí en las células reprogramadas. Respecto a la expresión de PPAR $\gamma$ , no se observó diferencia en su expresión entre las AMSCs tratadas con VPA+A8301 y las no tratadas, sólo se observó diferencia entre las células que fueron diferenciadas hacia adipogénesis y las que no fueron diferenciadas (Figura 34). En el caso de la expresión de Aggrecan, esta fue significativamente mayor en las células diferenciadas hacia condrogénesis que las que habían sido tratadas con VPA+A8301. La expresión de Runx2 si fue significativamente mayor en las AMSC tratadas con VPA+A8301 que en las no tratadas (Figura 34).

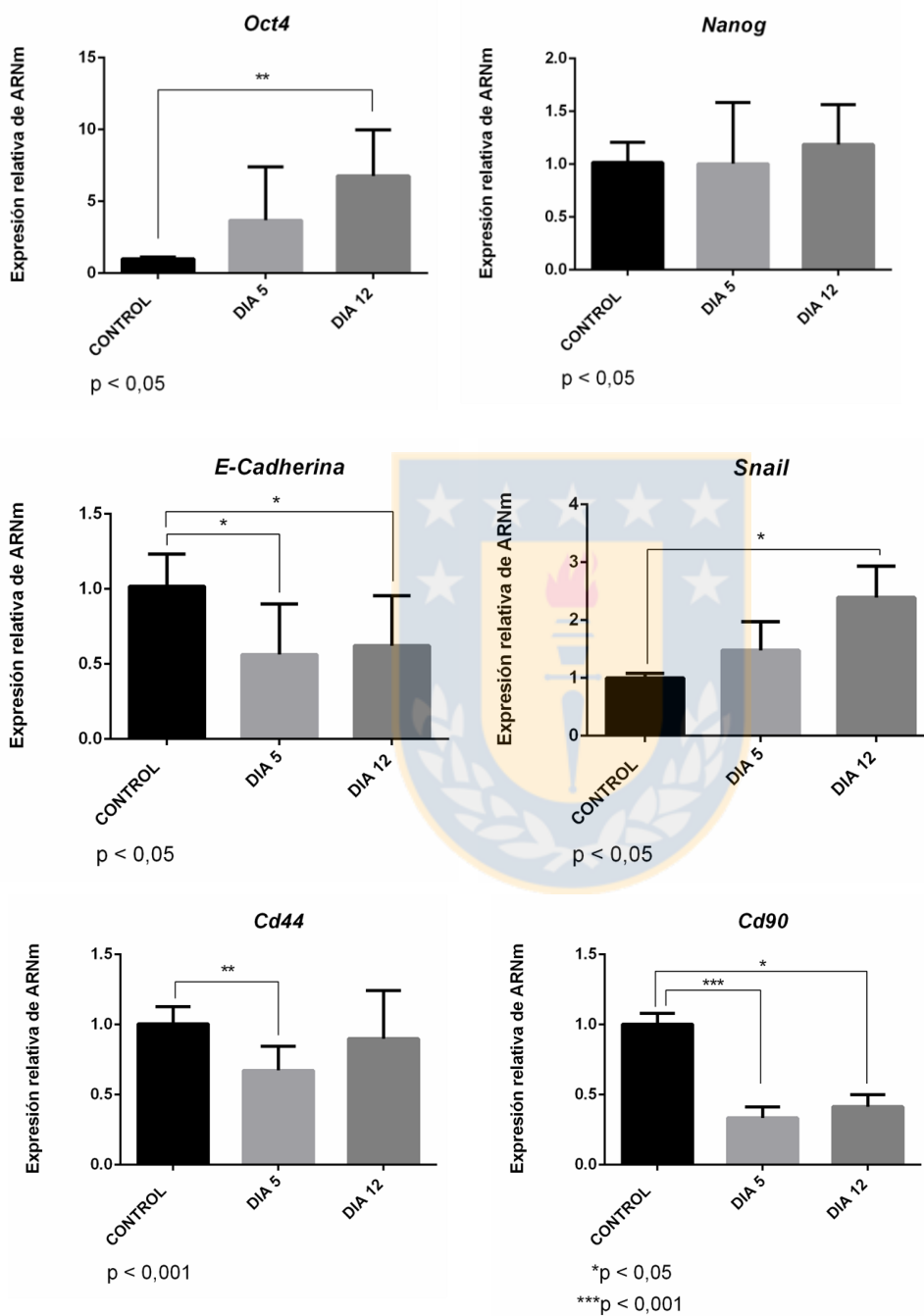


**Figura 34.** Ensayos de diferenciación de AMSC sometidas a reprogramación con VPA+A8301. (n=3). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. La prueba t fue empleada para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Fuente: Elaboración propia.

*Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie en AMSC tratadas con 5-AZA y h-PDGF-B*

Para evaluar los efectos del tratamiento se emplearon dos líneas celulares (línea 5 y línea 6). Al evaluarse la expresión de los genes de pluripotencia y marcadores de superficie se encontró que la reprogramación logró inducir una mayor expresión de OCT4 en las AMSCs al día 12 mientras que la expresión de NANOG no presentó diferencias significativas. La expresión de E-Cadherina disminuyó significativamente mientras que la expresión de SNAIL aumentó al día 12. La expresión

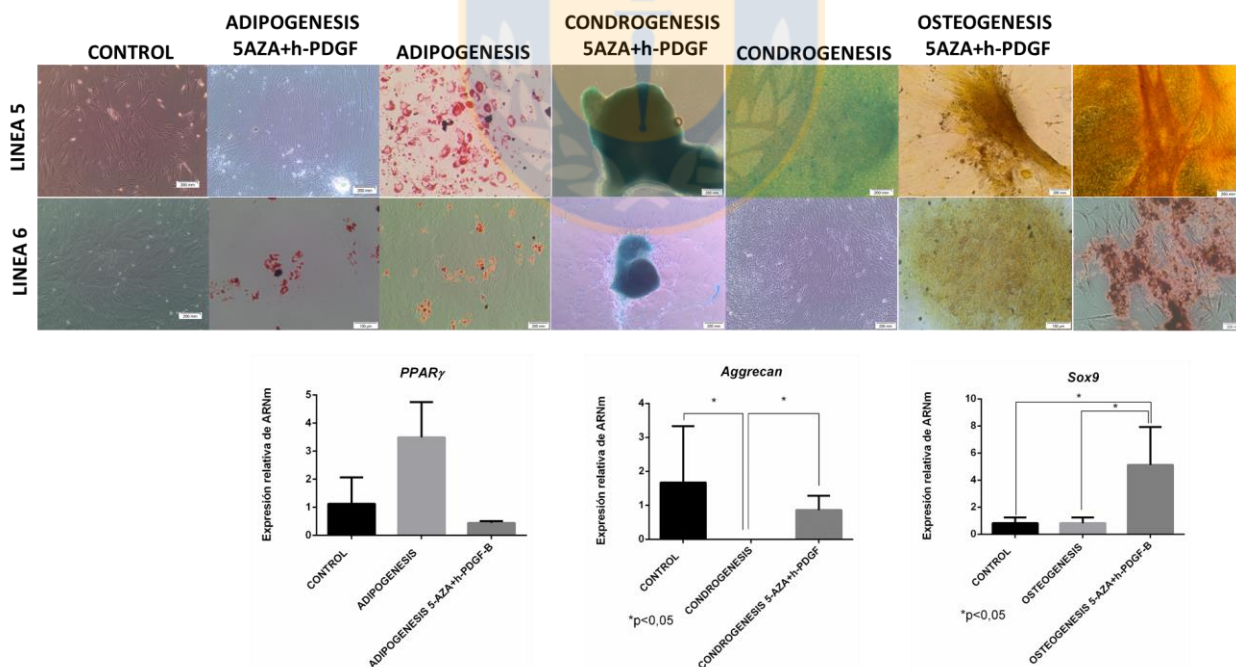
de CD44 disminuyó al día 5 del tratamiento mientras que la expresión de CD90 disminuyó significativamente a los días 5 y 12 del tratamiento con 5-AZA y h-PDGF-B (Figura 35).



**Figura 35.** Expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie en AMSC felinas tratadas con 5-AZA+h-PDGF-B. (n=2) El test de Kruskal Wallis fue empleado para determinar diferencias entre grupos. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,001. Fuente: Elaboración propia.

### Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSCs reprogramadas con 5-AZA + h-PDGF-B

Para evaluar si la reprogramación con los 4 factores podía tener un efecto sobre el potencial de diferenciación hacia linajes mesodérmicos, las AMSCs reprogramadas y no reprogramadas fueron diferenciadas hacia linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico. Las líneas 5 y 6 habían presentado inicialmente buena capacidad de diferenciación hacia estos linajes, sin embargo, la línea 5 sometida a reprogramación con 4 factores no tuvo capacidad de diferenciarse hacia este linaje en comparación con las mismas células no reprogramadas. En esta misma línea se pudo observar que la diferenciación hacia el linaje condrogénico fue superior con 5-AZA + h-PDGF-B + A8301 + VITC, mientras que para la diferenciación osteogénica no hubo diferencias apreciables. En la línea 6 no se observó ninguna diferencia en la diferenciación adipogénica entre las células reprogramadas y las no reprogramadas. Sin embargo, la diferenciación condrogénica tampoco se vio favorecida en las células no tratadas con 5-AZA + h-PDGF-B + A8301 + VITC ya que no hubo formación de pellet ni respuesta a la tinción con Alcian Blue. Respecto a la diferenciación osteogénica de la línea 6 tampoco se observó diferencia apreciable entre las células reprogramadas con las no reprogramadas. Adicionalmente se evaluó la expresión de genes relacionados con la diferenciación mesodérmica, para el caso de PPAR $\gamma$ , su expresión no presentó diferencias significativas entre las células tratadas y las no tratadas; la expresión de Aggrecan disminuyó considerablemente en las células que no fueron tratadas con 5-AZA + h-PDGF-B + A8301 + VITC, mientras que la expresión de Sox9 fue significativamente mayor en las células tratadas con 4 factores (Figura 36).



**Figura 36.** Ensayos de diferenciación mesodérmica de AMSC reprogramadas con 5-AZA + h-PDGF-B + A8301 + VITC. (n=2). Tinción con rojo alizarina para la diferenciación osteogénica, azul de alcian para diferenciación condrogénica y Oil Red para la diferenciación adipogénica. El test de Kruskal Wallis fue empleado para determinar diferencias en la expresión de los genes de diferenciación

entre los grupos tratamiento. Todos los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). \* $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

#### *Análisis de correlación entre la expresión de E-Cadherina y SNAIL en fibroblastos inducidos a multipotencia y AMSCs reprogramadas*

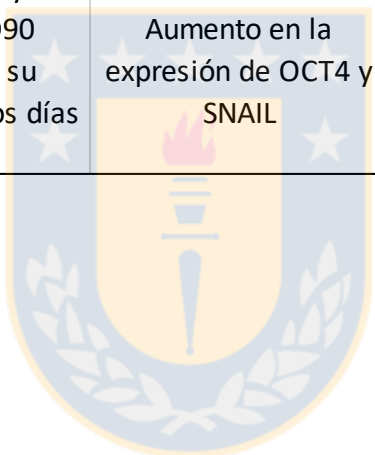
Se ha reportado que el gen SNAIL es un fuerte represor del factor de transcripción E-Cadherina. La expresión de SNAIL genera la diferenciación de células epiteliales hacia fenotipos fibroblastoides, cuando se está generando la transición epitelial a mesenquimal (Cano et al., 2000). Durante los análisis de expresión de ARNm para estos dos genes no se pudo determinar si existía un nivel de correlación entre la expresión de ambos. La correlación de Spearman se empleó para evaluar la asociación entre la expresión de ARNm del gen E-Cadherina y la expresión de SNAIL (dos variables cuantitativas). Dicha correlación de Spearman se eligió debido a que el número de muestras a evaluar era menor de 30 y los datos no cumplieron los supuestos de normalidad. Las correlaciones se realizaron al día 5 y al día 12 del tratamiento con las diferentes combinaciones de los tratamientos. La interpretación de los valores se realizó de acuerdo a la escala empleada por Hernández Sampieri y Fernández Collado (1998). La mayoría de las relaciones entre la expresión de E-Cadherina y SNAIL no fueron significativas ( $p > 0,05$ ) excepto para el tratamiento con 5-AZA+A8301+VITC+h-PDGF-B al día 12 donde la relación fue positiva considerable ( $r = 0,61$ ,  $p = 0,03$ ) y VPA+EGF al día 5 donde se presentó una relación negativa considerable ( $r = -0,59$ ,  $p = 0,03$ ).

En esta sección se caracterizaron las AMSCs de gato doméstico siendo positivas para la expresión de Cd90 por citometría de flujo, expresaron ARNm para OCT4, NANOG, CD44 y CD90, presentaron capacidad de migración y potencial de diferenciación mesodérmico. Se evaluaron dos tratamientos de reprogramación, VPA+A8301 y 5-AZA+A8301+VITC+h-PDGF-B, resultados que se resumen en la tabla 11.

**Tabla 11.** Resumen resultados obtenidos de la reprogramación de AMSC felinas con VPA + A8301 y 5-AZA + VITC + A8301 + h-PDGF-B.

TRATAMIENTO	EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE	EXPRESIÓN DE GENES DE MULTIPOTENCIA	DIFERENCIACIÓN MESODÉRMICA
<b>VPA + A8301</b>	CD44 y CD90 disminuyeron	No se presentó diferencia en la expresión	Se potenció diferenciación osteogénica con el tratamiento
<b>5-AZA + Vitamina C + A8301 + h-PDGF-B</b>	CD44 disminuye al día 5 y CD90 disminuye su expresión a los días 5 y 12	Aumento en la expresión de OCT4 y SNAIL	Se potenció diferenciación osteogénica con el tratamiento

Fuente: Elaboración propia.





## DISCUSIÓN GENERAL

### *Caracterización de fibroblastos y AMSCs felinas*

En este estudio se evaluó el uso de factores de crecimiento y remodeladores epigenéticos en la inducción de fibroblastos a iMSC y el efecto de estas mismas moléculas sobre AMSCs. Inicialmente los ensayos fueron realizados con plasma rico en plaquetas como recurso de factores de crecimiento y posteriormente se establecieron protocolos de reprogramación con EGF y h-PDGF-B. Para establecer una línea base de las características biológicas de las células de este estudio se realizó una caracterización tanto de fibroblastos como de AMSCs para determinar los niveles de expresión de genes de pluripotencia y marcadores de superficie. Los fibroblastos felinos fueron positivos para la expresión de ARNm de OCT4, NANOG, CD44 y CD90. Respecto a la expresión de OCT4 y NANOG, los resultados presentados aquí difieren de otros estudios reportados, en dónde no se observó expresión de estos genes en fibroblastos felinos (Gómez et al., 2015). La expresión de OCT4 en fibroblastos felinos fue validada por medio de qRT-PCR e inmunocitoquímica, lo cual coincide con estudios previos en fibroblastos humanos y bovinos que han reportado niveles basales de proteína y ARNm de este gen (Alt et al., 2011; Rodríguez-Álvarez et al., 2013). Respecto a la expresión de marcadores de superficie, los fibroblastos felinos comparten expresión con las AMSCs de CD44, CD90 y CD105 (Mumaw et al., 2015). La expresión de CD44 y CD90 en fibroblastos felinos se pudo identificar a partir de la expresión de ARNm ya que por medio de la citometría de flujo sólo fue posible evaluar la expresión de CD90. La expresión de ARNm de CD90 no presentó diferencias estadísticas entre fibroblastos y AMSCs pero CD44 si fue mayor en fibroblastos. Si bien este marcador de superficie se encuentra presente en casi todas las membranas celulares, su señalización en fibroblastos promueve migración y cicatrización al interactuar con el ácido hialurónico del cual es el receptor (Litwiniuk et al., 2016)

Los análisis de citometría de flujo fueron realizados para las AMSC y fibroblastos de gato, dónde se detectó la expresión de Cd90 para los tres tipos de células lo cual es consistente con otros reportes (Mumaw et al., 2015). Sin embargo, el porcentaje de expresión de Cd90 fue cercano al 30% mientras que en otros estudios el porcentaje de positividad es superior al 90%. Este resultado se atribuye principalmente a la baja especificidad de los anticuerpos para detectar la proteína de origen felino. En un principio se planteó la posibilidad de que la población de AMSC de gato fuese heterogénea, es decir, con presencia de fibroblastos, pero se ha reportado anteriormente y en este estudio se confirma, que tanto Cd90 como Cd44 no son confiables para diferenciar entre fibroblastos y mesenquimales ya que ambos tipos celulares son positivos para estos marcadores. En la citometría de flujo los porcentajes de expresión de los otros marcadores también fueron cercanos a cero (Halfon et al., 2011; Mumaw et al., 2015). Adicional a esto, en la especie felina tampoco se han establecido marcadores canónicos para caracterizar células madre mesenquimales y se han empleado los reportados en la especie humana como parámetro de evaluación. Las AMSCs de gato fueron negativas para la expresión de MHCII por citometría de flujo, lo que puede ser benéfico para terapias de tipo alogénico debido a su baja inmunogenicidad (Rutigliano et al., 2013). La caracterización de la expresión de genes de pluripotencia también se realizó por medio de expresión de ARN, las AMSC de gato fueron positivas para la expresión de

OCT4 y NANOG. Estos datos son consistentes con los reportados por Gómez et al (2015) con la excepción de que no reportó la expresión de Sox2 para las AMSCs en gatos domésticos (Gómez et al., 2015). Las AMSCs de gato demostraron capacidad de diferenciación mesodérmica tal como se ha reportado en otros estudios (Gómez et al., 2015; Kono et al., 2014).

El potencial de migración fue evaluado in vitro en las AMSCs felinas para determinar la capacidad de las MSC de moverse hacia un gradiente quimioattractante. Para esto se emplearon dos ensayos, transwell y scratch, en los cuales las AMSCs de gato demostraron potencial de migración en medio condicionado con ePRP. Reportes previos en la habilidad de migración de MSC de gato no han sido encontrados, lo cual dificulta realizar una comparación. La elección del PRP como attractante estuvo basada en su uso en combinación con MSCs en algunas terapias celulares. El PRP contiene importantes factores de crecimiento que actúan como quimioattractantes y mitógenos, tales como such as TGF- $\beta$ 1, VEGF, PDGF and IGF-1 (Bartold and Raben 1996, Vater et al 2011, Marx et al 2015). En general, en el presente estudio los resultados de migración fueron similar a las AMSCs de caninos (Al Delfi et al., 2016).

#### *Reprogramación de fibroblastos de felinos con remodeladores epigenéticos y plasma rico en plaquetas - PRP*

Los tratamientos establecidos en el presente estudio han sido adaptados a partir de los reportes de literatura de reprogramación de células somáticas diferenciadas hacia células madre mesenquimales, logrando la inducción de la expresión de Oct4 y Nanog y diferenciación hacia linajes mesodérmicos con el uso de 5-AZA (Brevini, Pennarossa, y Rahman, 2014; Chandrakanthan et al., 2016). Hasta el presente, solo se encontró en la extensa búsqueda bibliográfica, un estudio de inducción a multipotencia para especies animales diferentes a la murina (Soltani et al., 2018). Ese grupo reportó la dediferenciación inducida por pequeñas moléculas en MSC de médula ósea fetal de ovinos con el uso de dosis bajas de reversina (600 nM), con la cual se pudo inducir la expresión de Nanog y mantener la capacidad de diferenciación hacia adipocitos y osteocitos.

En el presente estudio se empleó la molécula 5-AZA junto con PRP con la finalidad de inducir características multipotentes en los fibroblastos felinos. Se estableció el tiempo de inducción a multipotencia de 12 días para los fibroblastos así como se había reportado para células como osteocitos primarios, adipocitos primarios y maduros de la especie murina (Chandrakanthan et al., 2016). Es difícil establecer si el mismo tiempo de reprogramación empleado en murinos sea el adecuado para fibroblastos felinos ya que al evaluar líneas por separado la expresión de genes de interés se pudo detectar al día 5 en algunas líneas y en otras a partir del día 12, pero en general los resultados obtenidos con el protocolo fueron aceptables, aunque sujetos a mejoras.

El uso de la 5-AZA en fibroblastos se ha reportado desde 18 horas en el caso de fibroblastos humanos y de 5 días en el caso de células diferenciadas de ratón (Chandrakanthan et al., 2016; Pennarossa et al., 2013). En el presente estudio, algunas líneas celulares tratadas con 5-AZA entraron en senescencia y por tal razón algunos experimentos no pudieron finalizarse. Se ha

reportado que la 5-AZA puede aumentar la cantidad de células muertas en cultivo debido a que es metabolizada a 5-aza-2'-deoxycytidine-trifosfato para ser incorporada en el ADN como sustituto de la citidina, pero aproximadamente el 80% de la 5-AZA es incorporada directamente al ARN (Stresemann y Lyko, 2008).

La dosis de los remodeladores epigenéticos también fue establecida de acuerdo a reportes bibliográficos, no obstante, se ha reportado que esta molécula es un poco inestable y ajustar la dosis de acuerdo al número de células a reprogramar, almacenar adecuadamente el reactivo y acortar los tiempos de uso de los medios de reprogramación pueden mejorar los resultados de inducción a multipotencia de los fibroblastos felinos (Brevini et al., 2016).

En este trabajo, empleamos 3 tratamientos con PRP y 5-AZA, más la adición de moléculas como A8301, bloqueadora de la vía TGF- $\beta$ , y vitamina C, la cual se ha reportado como inductora de la expresión de Nanog y con efecto proliferativo sobre las células (Esteban et al., 2010). Sin embargo, ninguno de esos tratamientos fue efectivo en generar inducción a la multipotencia, evaluados en términos de expresión de OCT4, NANOG y diferenciación mesodérmica. El tratamiento con 5AZA+A8301+VITC+PRP en fibroblastos disminuye la expresión OCT4, NANOG y E-Cadherina, y aumenta significativamente la expresión de SNAIL. Es probable que la dosis de A8301 no fue la suficiente para bloquear la vía de señalización TGF- $\beta$ , considerando además que el TGF- $\beta$  es el principal factor de crecimiento presente en el plasma rico en plaquetas. Razón por la cual se pudo anular el efecto de cada una de estas moléculas sin ejercer efecto sobre la plasticidad celular de los fibroblastos de felinos domésticos.

Por otra parte, el uso de VPA + PRP produjo cambios en el potencial de diferenciación mesodérmica en los fibroblastos. Se ha reportado que el VPA puede inducir la expresión de 273 genes específicos de células madre embrionarias, incluidos OCT4, NANOG, SOX2 y KLF4 (Moschidou et al., 2012). En este tratamiento específico de nuestro experimento, la expresión de OCT4 y NANOG no se logró inducir, aunque una de las líneas presentó capacidad de diferenciación mesodérmica. Por su parte, la expresión de OCT4 ha sido correlacionada con un incremento en la eficiencia de diferenciación de las MSCs hacia linajes osteogénicos y adipogénicos (Roche, Richard, y Favrot, 2007). Es probable que las líneas celulares que no se diferenciaron a linaje mesodérmico fallaron inicialmente en expresar OCT4 y/o NANOG. Por su parte, la expresión de NANOG se requiere para mantener características de potencia y auto renovación, generando represión transcripcional de genes que promueven diferenciación, sin embargo, su expresión en MSC puede ser reprimida en presencia de TGF- $\beta$  (Bahamonde et al., 2018; Mitsui et al., 2003; Silva et al., 2009). Se desconoce si la presencia de este factor de crecimiento pudo interferir directamente en la expresión de NANOG en los fibroblastos tratados con VPA + PRP, pero no se descarta el mismo efecto ya que en obtención de iPSC en las especies felina y bovina, Nanog se ha definido como un factor crítico para inducir un estado de pluripotencia en fibroblastos (Schwarz et al., 2014; Verma et al., 2013). La ausencia de Nanog hace que las células se retengan en el proceso de reprogramación, lo que impide adquirir las cualidades de una célula iPSC madura (Theunissen et al., 2011). La inducción de la expresión de Nanog podría ser crítica también en el proceso de inducción de fibroblastos hacia multipotencia.

Después de reprogramar las células con VPA + PRP sólo una línea presentó capacidad de diferenciación mesodérmica, mientras que las otras dos líneas presentaron una baja positividad a la tinción para diferenciación condrogénica, esto también pudo deberse al efecto inhibitorio del TGF- $\beta$  presente en el PRP para la inducción adipogénica mientras favorece la diferenciación hacia linajes condrogénicos y osteogénicos (Castro et al., 2014; Pattappa et al., 2010).

Es importante mencionar que en este experimento con VPA + PRP se emplearon 3 líneas celulares de fibroblastos para determinar si podrían existir diferencias en la plasticidad de estas células y por lo tanto respuestas diferentes al tratamiento. En la citometría de flujo sólo se logró detectar la expresión de CD90 con baja positividad en los diferentes días de tratamiento. La baja positividad de los fibroblastos felinos a los marcadores evaluados se atribuye a la baja especificidad de anticuerpos empleados. Por esta razón se realizó evaluación de la expresión de ARNm de marcadores de superficie CD44, CD90, CD105 y MHCII para cada línea celular. La presencia de marcadores como CD90, CD105 y CD44 son indicativos de multipotencia y se han documentado en MSC felinas (Gómez et al., 2015; Kono et al., 2014; Mumaw et al., 2015).

En el presente experimento se encontró una alta expresión de ARNm del marcador CD105 al día 5 de tratamiento pero disminuyó al día 12. CD105 tiene un rol importante en la diferenciación de MSC, permitiéndoles adquirir habilidad para diferenciarse hacia los tres linajes mesodérmicos (Roura et al., 2006). Por lo tanto, una baja expresión de CD105 puede ser indicativa de una baja capacidad de diferenciación y al no inducirse la expresión de este gen al final de la reprogramación se pudo limitar la capacidad de los fibroblastos inducidos a diferenciarse hacia los tres linajes mesodérmicos.

Por su parte, la expresión de ARNm de MHCII fue significativamente menor al día 12 de la reprogramación con VPA+PRP. Este resultado fue interesante ya que se considera a MHCII como la molécula clave para la presentación de antígenos y en generación de la respuesta inmune y generalmente las MSC presentan una baja expresión de este marcador, lo que facilita que puedan ser empleadas en terapias celulares (Wolk et al., 2003). Respecto a la expresión de CD90 no hubo diferencias significativas en su expresión durante el tratamiento de reprogramación, CD44 aumentó su expresión al día 5 de tratamiento pero nuevamente disminuyó al día 12. CD90 y CD44 son expresados normalmente en altos porcentajes en fibroblastos felinos y también en MSC (Mumaw et al., 2015). Otros marcadores como CD106 y CD146 pueden ser empleados para diferenciar entre MSC y fibroblastos, sin embargo no están comercialmente disponibles para reconocer epítopes felinos (Halfon et al., 2011).

En el ensayo de VPA + PRP se decidió evaluar también la expresión de vimentina y determinar el efecto que podría generar el uso de este coctel sobre su expresión, ya que es el principal componente de los filamentos intermedios en muchos tipos celulares y está asociada con la morfología mesenquimal, capacidad migratoria y proliferativa, encontrándose principalmente expresada en los fibroblastos (Charrier y Janmey, 2016; Mendez et al., 2010). En la inmunocitoquímica realizada a los fibroblastos reprogramados con VPA+PRP ésta fue detectada en todas las líneas celulares y en los diferentes días de tratamiento. La línea 4 presentó una

morfología más redondeada al día 5, lo cual podría estar relacionado con la expresión de vimentina. El objetivo principal de evaluar esta proteína fue determinar si podría ser un marcador que diferencie un fibroblasto de una célula menos diferenciada, ya que su expresión tiende a disminuir cuando las células van adquiriendo una morfología epitelial (Mendez, Kojima, & Goldman, 2010). Sin embargo, tiene la desventaja de expresarse en células endoteliales de capilares que se encuentren cercanos a fibroblastos y también ha sido identificada en neuronas (Lucotte et al., 2015).

Es probable además que algunas células hayan adquirido algún nivel intermedio de potencia entre fibroblastos y mesenquimales. Sin embargo, más allá de la expresión de los genes de interés y la capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos, es difícil determinar los efectos de las moléculas reprogramadoras, considerando que los fibroblastos y las AMSCs comparten muchos de los marcadores de superficie y que en una caracterización inicial encontramos positividad para la expresión de OCT4 en fibroblastos sin reprogramar (Denu et al., 2016; Ito et al., 2018). A pesar de estas limitaciones, se encontraron algunas semejanzas en estudios de reprogramación hacia iPSC. Aunque el interés específico del presente estudio no fue generar iPSCs, si se tuvo en cuenta las fases o etapas que involucran cambios morfológicos y de expresión de genes de las células que son inducidas. Se reporta que en la fase de iniciación de la reprogramación se presentaba una regulación a la baja en la expresión de marcadores de superficie específicos para los fibroblastos, entre ellos CD90 y CD44, y aumentaba la expresión de genes asociados a la pluripotencia (Brambrink et al., 2008; O'Malley et al., 2013). En nuestros experimentos, la expresión del ARN mensajero de CD90 disminuyó en la mayoría de los tratamientos de reprogramación y fue una característica muy marcada, la expresión de CD44 en términos generales fue estable mientras que en algunos tratamientos se detectó un aumento en la expresión de este marcador, sin embargo, los fibroblastos y las MSC tienen una alta positividad para este marcador, por lo cual tampoco resulta muy útil su evaluación en los tratamientos de inducción, lo que coincide con la literatura (Denu et al., 2016; Ito et al., 2018). La fase de iniciación se caracteriza por la pérdida del factor de transcripción SNAIL y el aumento de la expresión de E-Cadherina (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Sin embargo, en nuestros experimentos, la expresión de SNAIL se mantuvo o aumentó en la mayoría de los casos y la expresión de E-Cadherina aumentó en tratamientos específicos pero generalmente se mantuvo similar al grupo control. Esta primera onda o fase temprana finaliza cuando los genes asociados a la pluripotencia como NANOG y OCT4 comienzan a expresarse (Araki et al., 2010; Megyola et al., 2013).

Si bien, el balance SNAIL/E-Cadherina no resultó como en otras especies, si se detectó un aumento en la expresión de los genes maestros de la pluripotencia, como OCT4 y NANOG, dadas estas premisas se podría decir que el evento de reprogramación de fibroblastos felinos con los tratamientos instaurados logró por lo menos, atravesar esta primera fase. La fase intermedia o de maduración de la reprogramación, se ha descrito en la especie murina, caracterizándose por una expresión sostenida de Oct4, Nanog y Sox2 (Samavarchi-Tehrani et al. 2010). En el presente estudio no se evaluó la expresión de Sox2 debido a que en los reportes de AMSCs felinas caracterizadas, la expresión de Sox2 fue baja o nula pero se podría sugerir que debido a la

expresión de OCT4 y NANOG al día 5 o 12 del tratamiento, los fibroblastos inducidos a MSC pudieron llegar al inicio de la fase intermedia o fase de maduración (Gómez et al., 2015).

Es probable que la expresión de E-cadherina se viera reprimida debido a la presencia de TGF $\beta$  y/u otros factores de crecimiento presentes en el PRP (Chou et al., 2008). A su vez, el TGF $\beta$  juega un papel importante en el mantenimiento del estado mesenquimal, una de las razones por las cuales se empleó el PRP. El PRP también fue empleado por su alta concentración del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF, factor de crecimiento que se ha demostrado genera efectividad en protocolos de inducción a multipotencia (Chandranthanthan et al., 2016; El-Sharkawy et al., 2007). Por su parte, la E-Cadherina ha demostrado ser importante para el mantenimiento de la pluripotencia de ESCs y se sugiere es un regulador de la expresión de Nanog (Polo et al., 2012). Aunque la expresión de OCT4 se logró inducir en un par de tratamientos de reprogramación, la expresión de NANOG fue más discreta, probablemente vinculada a la represión en la expresión de E-Cadherina. Adicional a esto, la expresión de SNAIL, conocido como represor de la expresión de E-Cadherina, siempre estuvo alta tanto en fibroblastos como en AMSC (Cano et al., 2000).

La expresión de SNAIL es importante para el mantenimiento de la morfología mesenquimal de tipo fibroblastoide, razón por la cual es probable que se encuentre expresado aún en fibroblastos que hayan sido efectivamente inducidos a MSCs (Olmeda et al., 2007). Interesantemente, SNAIL también puede desencadenar el programa de transdiferenciación celular (Peinado, Olmeda, y Cano, 2007). En el tratamiento de reprogramación en el cual se empleó VPA + EGF, una marcada expresión de SNAIL fue observada.

SNAIL también está descrito como inductor de la transición epitelial a mesenquimal (EMTs) y juega un rol importante en la supervivencia celular. Su expresión puede ser inducida por la señalización de receptores tirosina-kinasa, así como por FGF y EGF (Wu y Zhou, 2010). Interesantemente, en los ensayos de inducción con VPA+EGF (5 y 10ng) se vio aumentada su expresión al día 12 de tratamiento.

Se ha sugerido que el uso de EGF a bajas concentraciones puede incrementar significativamente la proliferación y migración celular sin afectar el estado indiferenciado de las ESCs (Park et al., 2011; Vassaux et al., 1994), razón por la cual se decidió emplear este factor de crecimiento en dos concentraciones distintas (5 y 10 ng/ml), junto con VPA en un protocolo de inducción a multipotencia para fibroblastos felinos. Durante el ensayo de reprogramación empleando la molécula VPA y el factor de crecimiento EGF se logró inducir la expresión de Oct4 en los fibroblastos. Sin embargo, estas células no presentaron capacidad de diferenciarse posteriormente hacia linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico.

El EGF aunque presenta un efecto estimulante sobre la proliferación celular, puede presentar tanto efectos negativos como positivos sobre la diferenciación de células madre mesenquimales hacia linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico (Kalyani, Mujtaba, y Rao, 1999). Sin embargo, el uso de EGF a una concentración de 5 ng/ml puede afectar el estado pluripotente de las AMSCs disminuyendo la expresión de Oct4 y Sox2 (Hu et al., 2013). Respecto a estas dos



premisas, en el experimento dónde se evaluó el efecto del EGF en el coctel de reprogramación, la expresión de Oct4 no se vio afectada, al contrario, se logró inducir su expresión en los fibroblastos inducidos. No obstante, no se puede evidenciar si este resultado fue gracias al uso del VPA ya que no se manejaron tratamientos por separado. Es importante aclarar que el medio de cultivo celular establecido para fibroblastos contiene normalmente una concentración de 10 ng/ml de EGF y el grupo control del estudio se encontraba en esas condiciones. Se podría plantear la hipótesis de que independiente del factor de crecimiento, la inducción de la expresión de Oct4 está más relacionada con el uso de remodeladores epigenéticos.

El criterio de funcionalidad es el más importante desde el punto de vista práctico para inducir células a un estado de potencia superior, independientemente de la identificación de los mediadores involucrados, ya que estos pueden ser específicos de especie, por eso, la evaluación de la diferenciación mesodérmica fue clave en nuestros experimentos. En ese sentido, no hubo respuesta de los fibroblastos reprogramados por lo que se podría presumir que hubo un efecto negativo del EGF. Una posibilidad alternativa a la ausencia de diferenciación mesodérmica de los fibroblastos reprogramados con VPA + EGF, puede radicar en la acción del VPA, ya que se ha reportado que aunque favorece expresión celular, migración y diferenciación terminal, puede bloquear las vías que llevan a la diferenciación hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos y favorecer aquellas que habilitan la diferenciación hacia astrocitos, oligodendrocitos y linajes neurogénicos en células mesenquimales murinas (Jang y Jeong, 2018; Kretsovali, Hadjimichael, y Charmpilas, 2012). Estos efectos se han descrito en MSCs, no directamente en fibroblastos, pero podría estar relacionado con la incapacidad de las células reprogramadas de adquirir potencial de diferenciación mesodérmico con el tratamiento con VPA + EGF.

#### *Reprogramación de fibroblastos de felinos con remodeladores epigenéticos y factor de crecimiento derivado de plaquetas - h-PDGF-B*

Debido a los resultados no concluyentes de reprogramación con el uso del plasma rico en plaquetas, se estandarizaron dos protocolos de reprogramación con el factor mayoritario de dicha fracción: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (h-PDGF-B), obtenido a partir de la transfección de células de mamíferos (SIHA) con el plásmido codificante para dicha proteína humana. En uno de estos protocolos se usó VPA como remodelador epigenético, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el protocolo de reprogramación con VPA+PRP; en el segundo protocolo se usó un cóctel de 4 factores (5-AZA + vitamina C + A8301 + h-PDGF-B). Como se mencionó en un principio, Chandrakanhtan y colaboradores (2016) lograron la conversión de células diferenciadas hacia células mesenquimales con el uso de 5-AZA y PDGF-AB/PDGF-B, partiendo del postulado de que 5-AZA induce la expresión de los receptores para PDGF (PDGFR) y demetilación de los promotores de Oct4 (Chandrakanthan et al., 2016). Considerando estos reportes se estableció el uso de 5-AZA y VPA en los coteles de reprogramación junto con h-PDGF-B para los fibroblastos felinos. La adición de la vitamina C al protocolo de inducción con 4 factores se realizó teniendo en cuenta el efecto de esta molécula sobre la regulación de las vías de



señalización de la apoptosis, favoreciendo la proliferación celular y por inducir indirectamente la expresión de Nanog (Esteban et al., 2010).

Con el tratamiento con VPA + h-PDGF-B se logró inducir la expresión de OCT4 al día 5 de tratamiento y la expresión de NANOG desde el día 12. La expresión de Oct4 fue positiva también por inmunocitoquímica y los ensayos de diferenciación mesodérmica fueron positivos para los tres linajes. Cabe mencionar que la línea reprogramada con VPA + h-PDGF-B fue la misma empleada con el tratamiento con VPA + PRP (línea 4), que dio resultados sugerentes de haber adquirido características multipotentes. En el tratamiento con VPA + h-PDFG-B, estas características fueron mucho más notorias, especialmente para la diferenciación condrogénica y osteogénica; la diferenciación adipogénica fue positiva para colonias aisladas en el cultivo celular y probablemente esto no fue significativo para que la expresión de PPAR $\gamma$  fuera diferente entre el control y las células reprogramadas. Aunque se planteaba que el uso del PRP pudiera interferir con la diferenciación adipogénica por la presencia del TGF $\beta$ , en este caso podría atribuirse más a una propiedad de la línea celular. Partiendo de la hipótesis de que el nivel de plasticidad celular es diferente en cada línea, esta misma línea fue evaluada con otro coctel de reprogramación de 8 factores (5-AZA, ALK, A8301, CHIR99021, PD0325901, LIF, h-PDGF-B, b-FGF) modificado de Li et al., (2017) por 6 días. Sin embargo, no hubo diferencias en la expresión de ninguno de los genes evaluados, pero sí una respuesta a los ensayos de diferenciación mesodérmica, siendo similares a los tratamientos anteriores, dónde la diferenciación adipogénica fue apenas visible en algunas células aisladas (datos no incluidos en el trabajo). En este tratamiento se emplearon dos bloqueadores de la vía TGF $\beta$ , partiendo de que esta vía de señalización puede afectar la diferenciación adipogénica y su inhibición puede favorecer el estado indiferenciado y la clonogenicidad, sin embargo, los resultados fueron muy similares a los otros tratamientos (Gurung, Werkmeister, y Gargett, 2015).

En el tratamiento con 4 factores se logró en una línea celular la expresión de genes de pluripotencia y diferenciación hacia tres linajes mesodérmicos. En este tratamiento se adicionó vitamina C por las razones descritas anteriormente y para evitar que durante la reprogramación las células entraran en en arresto celular en las fases G0/G1, y para limitar los efectos nocivos de la acumulación de especies oxígeno reactivas (ROS), situación que ha sido reportada por otros investigadores (Cloos, Christensen, Agger, & Helin, 2008; Esteban et al., 2010; Ruiz et al., 2011). Las líneas celulares de fibroblastos felinos con el protocolo de inducción que incluía a la vitamina C proliferaron y se mantuvieron en cultivo mucho más tiempo que aquellas que no tenían este componente y fue determinante para que las líneas celulares llegaran hasta la fase final del experimento sin entrar en senescencia, situación que con otros tratamientos se presentó perdiendo el n experimental, razón por la cual algunos resultados reportados hacen referencia a una sola línea celular.

Con el tratamiento de los fibroblastos felinos con 4 factores, la expresión de OCT4 y NANOG tendió a ser mayor pero no fue estadísticamente significativa, por su parte la expresión de CD90 disminuyó significativamente, mientras que la expresión de CD44 permaneció estable; con este tratamiento se presentó lo mismo que en los anteriores respecto a la expresión de estos dos

marcadores. Sin embargo, en comparación con los cocteles de inducción a multipotencia anteriores, no se había logrado obtener diferenciación adipogénica tan marcada como en la línea 6.

Los tratamientos empleados generaron la inducción de características multipotentes en los fibroblastos felinos, sin embargo, existe un efecto individual de las células, no se puede descartar la posibilidad de que tanto en el cultivo original, así como con los tratamientos se hayan enriquecido poblaciones de MSC de piel que pudieron ser aisladas conjuntamente con los fibroblastos. Estas células han sido aisladas anteriormente desde la dermis humana y se han logrado diferenciar hacia linajes mesodérmicos, incluso hacia células neuronales (Toma et al., 2001; Toma, et al., 2005)

Los fibroblastos y las MSC comparten ciertas características fenotípicas y bioquímicas que pueden potencialmente afectar la capacidad de discriminar entre fibroblastos nativos y fibroblastos inducidos a mesenquimales en nuestros experimentos. De acuerdo a Pittenger, 1999, los fibroblastos no tienen capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos o potencial de formación de colonias, sin embargo este criterio no es respaldado por otros reportes en que se equiparan los fibroblastos y las MSC en su capacidad de formación de colonias y potencial de diferenciación mesodérmica (Liu et al., 2010; Alt et al., 2011; Denu et al., 2016). Los reportes mencionados anteriormente se refieren a fibroblastos fetales y expresaban LIF. Todos los fibroblastos de nuestros experimentos, tanto controles como inducidos son adultos. En el presente estudio, los grupos controles, fibroblastos sin reprogramar, también fueron sometidos a ensayos de diferenciación mesodérmica y no presentaron ningún indicio de cambios morfológicos o diferenciación hacia algún linaje mesodérmico, mientras que los reprogramados sí lo hicieron.

En el ensayo de formación de colonias se emplearon fibroblastos reprogramados con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B y AMSCs para realizar la comparación. En el tratamiento con 5-AZA + A8301 + VITC + h-PDGF-B, cuando se sembraron a baja densidad (250 células/cm<sup>2</sup>), no hubo diferencias en el número de UFC entre MSC, control (fibroblastos sin reprogramar), línea 4 y línea 6 reprogramadas. Sin embargo, a medida que aumentaba la densidad de células sembradas por cm<sup>2</sup>, la eficiencia de UFC fue claramente mayor entre las MSC que en el control y todas las líneas reprogramadas. Se esperaba por lo menos que las líneas de fibroblastos reprogramadas presentaran un mayor número de colonias debido al efecto mitogénico del PDGF, el cual se ha reportado anteriormente en MSC pero esto no ocurrió (McIntyre y Bjornson 1986). De alguna forma, la reprogramación de los fibroblastos afectó la capacidad de estos para formar colonias.

#### *Reprogramación de AMSCs de felinas con remodeladores epigenéticos y factores de crecimiento*

En el presente estudio también se evaluó el efecto de moléculas reprogramadoras y factores de crecimiento sobre AMSC de gato doméstico. Se ha establecido que las MSC de felinos presentan senescencia en fases tempranas, lo que no permite mantener durante mucho tiempo un cultivo celular para su caracterización completa y experimentación posterior (Gómez et al., 2015). En un

principio se caracterizaron AMSC de gato doméstico y güiña con la finalidad de que fueran sometidas ambas a ensayos con las moléculas reprogramadoras. Sin embargo, las AMSCs de güiña entraron en senescencia a partir de P5, lo que sólo permitió su caracterización. Cabe destacar que otra limitante fue el número de líneas celulares de las especies silvestres, que se restringió solo a una.

Las AMSCs de gato doméstico fueron caracterizadas y sometidas a ensayos de reprogramación con remodeladores epigenéticos, un inhibidor de la línea TGF- $\beta$  y un factor de crecimiento presente en el PRP. A diferencia de la reprogramación de los fibroblastos dérmicos felinos, con las AMSCs no se empleó el PRP como componente de los protocolos. Una de las razones principales es la presencia del TGF- $\beta$  en el PRP que puede inducir la diferenciación de las AMSC en el medio de cultivo, principalmente hacia linajes condrogénico y osteogénico (Zhang y Wang, 2010).

Aunque se ha reportado que el VPA estimula proliferación de células hematopoyéticas durante los ensayos del presente estudio se observó baja proliferación celular con este tratamiento (datos no mostrados), ya que las células tardaban un poco más en llegar a confluencia y la línea celular 1 posterior a los tratamientos y ensayos de diferenciación entró en senescencia (Bug et al., 2005). Estas observaciones coinciden con otro estudio en el que se reporta que el VPA aplanaba la morfología de las MSC e inhibía su crecimiento (Lee et al., 2009). VPA activa el factor de transcripción de p21CIP1/WAF1 por incremento en la acetilación de la histona H3 y H4 y eventualmente bloquea el ciclo celular en la fase G2/M (Lee et al., 2009).

Otro estudio reporta que la proliferación de las AMSC humanas puede ser inhibida en una dosis dependiente de VPA (superior a 1mM) o en cultivos a largo plazo con este inhibidor desacetilasa (superior a 24 horas) (Lee et al., 2009). Sin embargo, se ha reportado que un pre tratamiento de las MSC por 4 días con VPA (1 mM) puede inducir la diferenciación osteogénica e incrementar la expresión de RUNX2 (Cho et al., 2005). En el presente estudio ese efecto se pudo comprobar en la diferenciación osteogénica de las AMSCs tratadas con VPA + A8301 por 12 días (los primeros 5 días con VPA), dónde la expresión de RUNX2 fue superior en estas células que en las células no tratadas.

Adicionalmente se ha reportado que el potencial de diferenciación mesodérmica puede verse afectado con el uso del VPA, especialmente la diferenciación adipogénica en AMSCs de ratón y humano por inhibición de la expresión de PPAR $\gamma$  (Fajas et al., 2002; Lagace y Nachtigal, 2004; S. Lee et al., 2009). En este estudio, la línea 1, la cual posteriormente entró en senescencia, no presentó la misma capacidad de diferenciación hacia los linajes mesodérmicos en comparación con las otras dos líneas, en las cuales no se observaron diferencias entre las AMSC tratadas y no tratadas. En conclusión, con el tratamiento con VPA + A8301 no se logró inducir mejores características de las AMSCs con excepción de favorecer positivamente la diferenciación osteogénica.

Debido a los pobres resultados con el uso del VPA, se decidió evaluar otro remodelador epigenético junto con la vitamina C, un inhibidor de la vía TGF $\beta$  y el factor de crecimiento h-PDGF-

B, a este tratamiento se le nombró como 4 factores de reprogramación y se evaluaron sus efectos sobre dos líneas de AMSCs de gato doméstico (línea 5 y línea 6). Se observó una inducción de la expresión de OCT4 en la línea 5 durante los días del tratamiento y en la expresión de NANOG fue significativamente mayor al día 5 de tratamiento. La expresión de E-Cadherina en la línea 5 disminuyó al día 5 de tratamiento mientras la expresión de Snail aumento al día 12; la expresión de Cd44 permaneció estable y la de CD90 disminuyó. Aunque la expresión de OCT4 y NANOG se logró inducir, con este tratamiento la diferenciación adipogénica se vio inhibida mientras que la diferenciación condrogénica y osteogénica fue mucho más marcada cuando se compara con las células sin reprogramar. Para el caso de la línea 6, la expresión de OCT4, E-Cadherina y CD90 disminuyó considerablemente, NANOG permaneció estable, mientras que SNAIL y CD44 aumentaron su expresión al día 12. La diferenciación mesodérmica de esta línea fue muy similar a la línea 5 con la diferencia de que hubo diferenciación adipogénica tanto en las células reprogramadas como las no reprogramadas aunque no fue tan marcada como en las de la línea 5 sin reprogramar.

Aunque se esperaba un menor efecto negativo con el uso de la 5-AZA sobre las MSC felinas, los resultados fueron coincidentes con otros reportes en los que MSC expuestas a este factor pierden su capacidad de diferenciación adipogénica (Kretsovali et al., 2012). También se ha reportado que el potencial de diferenciación osteogénico de las MSC puede disminuir con el uso de la 5-AZA pero eso no se observó en el presente estudio, al contrario, la expresión de SOX9, que fue evaluada para determinar capacidad de diferenciación osteogénica, presentó una mayor expresión en las células reprogramadas con los 4 factores (Kretsovali et al., 2012). También se ha reportado un incremento en la capacidad de generar condrocitos de las MSC con el uso de 5-AZA y así mismo un incremento en la expresión de Aggrecan. En este caso se observó que las líneas 5 y 6 si presentaron mayor capacidad de diferenciación hacia el linaje condrogénico con el uso de 4 factores en comparación con las células que no fueron reprogramadas (Kretsovali et al., 2012). Sin embargo, la expresión de Aggrecan de las células tratadas no presentó diferencias en la expresión al compararse con el grupo control. La respuesta de las AMSCs al uso de los 4 factores en favorecer la diferenciación osteogénica y condrogénica puede atribuirse a la respuesta en la expresión génica que genera la 5-AZA por la demetilación del ADN, especialmente la expresión de genes que promueven la señalización de las BMP, las AMSC presentan una mejor respuesta en la diferenciación hacia linajes osteogénico y condrogénico (Zuscik et al., 2004). La mayor expresión de SOX9 en este caso, pudo inducir la expresión de las BMP2 y a su vez reprimir la expresión de RUNX2, gen que en este ensayo no fue evaluado, ya que Sox9 es un gen global indicativo de la capacidad de diferenciación hacia linajes condrogénico y osteogénico (Liao et al. 2014; Yamashita et al. 2009; Symon y Harley 2017). Sumado a esto, se empleó en este coctel de reprogramación vitamina C, un potente mitógeno y un factor de crecimiento que tal vez pudieron direccionar la respuesta de las AMSC hacia la diferenciación osteogénica y condrogénica.

## Comentarios finales

En el presente estudio se planteó como objetivo general evaluar la plasticidad de células somáticas felinas, tanto fibroblastos como células madre derivadas de tejido adiposo en su capacidad de inducción a multipotencia y mejoramiento de características propias de las células AMSC bajo el efecto de remodeladores epigenéticos. En este estudio se reporta los primeros ensayos de inducción a multipotencia para fibroblastos felinos.

De este estudio se puede concluir que los fibroblastos felinos son positivos para la expresión de ARNm de OCT4, NANOG, CD44, CD90, y vimentina, compartiendo muchas de estas características con las MSCs, lo que hace difícil discriminar entre estos tipos celulares. La expresión endógena de Oct4 en fibroblastos felinos se reporta en este estudio, la cual no había sido reportada en fibroblastos de esta especie.

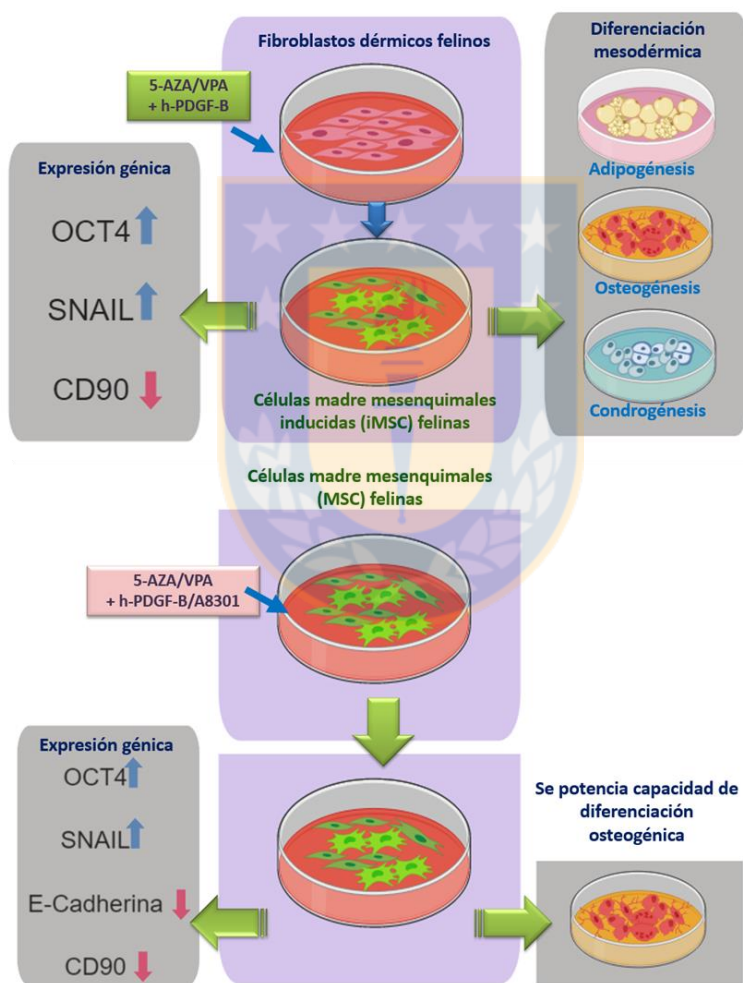
De los diferentes tratamientos de inducción a multipotencia, en aquellos en los que se emplearon 5-AZA y PRP no generaron cambios significativos en la plasticidad celular de los fibroblastos. Es probable que el PRP como fuente de varios factores de crecimiento pueda interferir negativamente en la adquisición de características multipotentes. Sin embargo, el tratamiento con VPA + PRP sí generó cambios significativos a nivel celular, indicativos de reprogramación hacia multipotencia, tales como capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos. VPA induce expresión de OCT4 en fibroblastos felinos tanto con el uso del factor de crecimiento derivado de plaquetas y el EGF. La expresión de CD44 y CD90 no presentaron cambios significativos y no fue discriminativo para determinar un mayor nivel de multipotencia (no se muestran los datos). Por otro lado, la combinación de los remodeladores epigenéticos (VPA y 5-AZA) con el h-PDGF-B pudieron inducir características de multipotencia en fibroblastos felinos, tales como capacidad de diferenciación hacia los tres linajes mesodérmicos, aumento en la expresión de OCT4, SNAIL y disminución en la expresión de CD90 (Figura 37).

Se podría concluir que identificada la expresión de OCT4 y la disminución de la expresión de CD90 en los tratamientos efectivos, el evento de reprogramación de fibroblastos felinos alcanzó la primera fase de reprogramación descrita en la literatura para la obtención de células madre pluripotentes inducidas. Se considera que la falla en la expresión del factor de transcripción Nanog puede limitar la inducción a multipotencia de los fibroblastos felinos.

Respecto a los remodeladores epigenéticos, 5-AZA y VPA, se concluye que pueden interferir con la diferenciación mesodérmica, especialmente la diferenciación adipogénica, tanto en fibroblastos como en AMSCs de felinos. Respecto a la plasticidad celular de las células somáticas diferenciadas y las AMSCs se puede postular que existe una capacidad inherente a cada línea que le permite responder frente a las moléculas reprogramadoras de una forma diferente, característica que se puede atribuir a los patrones de metilación y acetilación, razón por la cual algunos tratamientos fallaron para inducir características de multipotencia en líneas específicas. Sin embargo, se requiere de otros análisis para poder corroborar esta hipótesis.

Las AMSCs fueron sometidas a ensayos de reprogramación con la finalidad de mejorar sus características de multipotencia y retrasar los eventos de senescencia que se reportan en fases tempranas, sin embargo, lo que se obtuvo fue potenciar la diferenciación de de AMSCs hacia el linaje osteogénico, lo cual representa un potencial uso en terapia celular como regeneración de tejido óseo (Figura 36).

No se presentó una correlación entre la expresión de E-Cadherina y SNAIL en los fibroblastos y AMSCs tratadas con los cocteles de reprogramación. Probablemente la expresión de SNAIL es requerida para mantener las características multipotentes de las AMSCs y la expresión de E-Cadherina todavía es baja ya que es un marcador más relacionado con pluripotencia que con multipotencia, sin embargo, la expresión de uno no afectaba la expresión del otro.



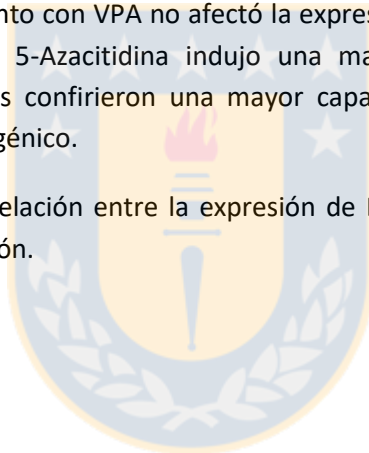
**Figura 37.** Resumen de los efectos de los remodeladores epigenéticos (VPA y 5-AZA) más el h-PDGF-B sobre fibroblastos y AMSCs felinas. Fuente: Elaboración propia.



## CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados en esta investigación y a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- Tanto los fibroblastos como las AMSCs expresan ARNm de CD44 y CD90 así como OCT4, siendo la expresión de este mayor en AMSCs. La expresión de NANOG fue superior también en AMSCs que en fibroblastos felinos.
- La inducción de características de multipotencia en fibroblastos felinos se logró tanto con el uso de VPA como de 5-Azacitidina en combinación con factores de crecimiento.
- Con los protocolos de inducción a multipotencia se logró inducir la sobre-expresión de genes de pluripotencia en fibroblastos felinos, principalmente OCT4, más no se presentó una diferencia en la expresión de marcadores de superficie. Los fibroblastos reprogramados presentaron capacidad de diferenciación mesodérmica.
- En las AMSCs el tratamiento con VPA no afectó la expresión de genes de interés, mientras que el tratamiento con 5-Azacitidina indujo una mayor expresión de OCT4. Ambas moléculas remodeladoras confirieron una mayor capacidad de diferenciación de estas células hacia linaje osteogénico.
- No se encontró una correlación entre la expresión de E-Cadherina y SNAIL durante este proceso de reprogramación.





## REFERENCIAS

1. Agung, M., Ochi, M., Yanada, S., Adachi, N., Izuta, Y., Yamasaki, T., Toda, K., 2006. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sport. Traumatol Arthrosc* 14, 1307–1314.
2. Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., 2007. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 7, 11.
3. Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., Itskovitz-Eldor, J., 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70, 837–45.
4. Angelini, A., Castellani, C., Vescovo, G., Thiene, G., 2004. Pathological evidence of stem cell regeneration in the heart. *Int J Cardiol* 96, 499–504.
5. Araki, R., Jincho, Y., Hoki, Y., Nakamura, M., Tamura, C., Ando, S., Kasama, Y., Abe, M., 2010. Conversion of ancestral fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28, 213–220.
6. Arzi, B., Kol, A., Murphy, B., Walker, N.J., Wood, J.A., Clark, K., Verstraete, F.J.M., Borjesson, D.L., 2015. Mesenchymal Stem Cell Culture and Expansion : Implications for Animal Model Development 24, 814–824.
7. Arzi, B., Mills-Ko, E., Verstraete, F., Kol, A., Walker, N., Badgley, M., Fazel, N., Murphy, W., Vapniarsky, N., Borjesson, D., 2016. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *Stem Cell Translational Med.* 5, 1–12.
8. Augello, A., Kurth, T., De, B., 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater* 20, 121–133.
9. Ben-Nun, I.F., Montague, S.C., Houck, M.L., Tran, H.T., Garitaonandia, I., Leonardo, T.R., Wang, Y.C., Charter, S.J., Laurent, L.C., Ryder, O.A., Loring, J.F., 2011. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods* 8, 829–831.
10. Biswas, D., Jiang, P., 2016. Chemically induced reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells and neural cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
11. Bockeria, L., Bogin, V., Bockeria, O., Le T, A. B., Woods, E. J., Brown, A. A., Patel, A.N., 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *J Transl Med.* 11, 1186.

12. Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., Fujinaga, T., 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319, 243–253.
13. Bouwens, L., 1998. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech* 43, 332–336.
14. Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., Jaenisch, R., 2008. Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell* 2, 151–159.
15. Brevini, T.A.L., Pennarossa, G., Maffei, S., Zenobi, A., Gandolfi, F., 2016. Epigenetic Conversion as a Safe and Simple Method to Obtain Insulin-secreting Cells from Adult Skin Fibroblasts Increase Cell Plasticity Using the De-methylating Agent 5-aza-CR. *J. Vis. Exp.* 109, 1–7.
16. Buganim, Y., Faddah, D.A., Jaenisch, R., 2013. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.* 14, 427–439.
17. Cabezas, J., Lara, E., Pacha, P., Rojas, D., Veraguas, D., Saravia, F., Rodríguez-Alvarez, L., Castro, F.O., 2014. The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 550–559.
18. Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729–740.
19. Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A., 2000. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76.
20. Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641-50.
21. Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Garcia, A.F., Novais, J.B., Silva-Frade, C., Ferrarezi, M.C., Gameiro, R., 2012. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol.* 12, 18.
22. Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., Troyer, D., 2006. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 8.
23. Castro-López, J., Planellas, M., X, R., Lloret, A., 2011. Feline chronic gingivostomatitis : a retrospective study of 27 cases. *Clin. Vet. Peq Anim* 31, 151–158.
24. Cebrian-Serrano, A., Stout, T., Dinnyes, A., 2013. Veterinary applications of induced pluripotent stem cells: regenerative medicine and models for disease? *Vet. J.* 198, 34–42.

25. Cervelló, I., Martínez-Conejero, J.A., Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simón, C., 2007. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum. Reprod.* 22, 45–51.
26. Chaffer, C.L., Brennan, J.P., Slavin, J.L., Blick, T., Thompson, E.W., Williams, E.D., 2006. Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 11271–11279.
27. Chan, R.W.S., Schwab, K.E., Gargett, C.E., 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* 70, 1738–50.
28. Chandrakanthan, V., Yeola, A., Kwan, J.C., Oliver, R.A., Qiao, Q., Kang, Y.C., Zarzour, P., Beck, D., Boelen, L., Unnikrishnan, A., Villanueva, J.E., Nunez, A.C., Knezevic, K., Palu, C., Nasrallah, R., Carnell, M., Macmillan, A., Whan, R., Yu, Y., Hardy, P., Grey, S.T., Gladbach, A., Delerue, F., Ittner, L., Mobbs, R., Walkley, C.R., Purton, L.E., Ward, R.L., Wong, J.W.H., Hesson, L.B., Walsh, W., Pimanda, J.E., 2016. PDGF-AB and 5-Azacytidine induce conversion of somatic cells into tissue-regenerative multipotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1–10.
29. Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., Rossant, J., 2006. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* 10, 615–24.
30. Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E., Speck, N.A., 2009. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457, 887–91.
31. Chera, S., Baronnier, D., Ghila, L., Cigliola, V., Jensen, J.N., Gu, G., Furuyama, K., Thorel, F., Gribble, F.M., Reimann, F., Herrera, P.L., 2014. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic  $\delta$ -cells into insulin producers. *Nature* 514, 503–507.
32. Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., 2009. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.
33. Choi, J., Lee, B., Park, H., Song, J., Shin, S., Lee, J., Wang, S., Jung, J., 2015. Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* 36, 85–99.
34. Cloos, P. A., Christensen, J., Agger, K., & Helin, K., 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev.* 22, 1115–1140.

35. Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H., Shakibaei, M., 2007. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: A biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem. Cell Biol.* 128, 507–520.
36. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–13.
37. Dahlgren, L., 2009. Fat-derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. In: *World Conference on Regenerative Medicine.*, in: *Regen Med Suppl.*
38. Dankchakoff, V., 1916. Origin of the blood cells. Development of the haematopoietic organs and regeneration of the blood cells from the standpoint of the monophyletic school. *Anat Rec* 10, 397–413.
39. David, L., Polo, J.M., 2014. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res.* 12, 754–761.
40. Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
41. De Bari, C., Dell’Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F.P., 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 1928–1942.
42. De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Fraser, J.K., 2003a. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett.* 89, 267–270.
43. De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Drago, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H., 2003b. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs* 174, 101–109.
44. Defourny, J., Mateo Sánchez, S., Schoonaert, L., Robberecht, W., Davy, A., Nguyen, L., Malgrange, B., 2015. Cochlear supporting cell transdifferentiation and integration into hair cell layers by inhibition of ephrin-B2 signalling. *Nat. Commun.* 6, 7017.
45. Denham, M., Conley, B., Olsson, F., Cole, T., Mollard, R., 2005. Stem cells: an overview. *Curr Protoc Cell Biol* 23, 23.
46. DiBartola, S., Rutgers, H., Zack, P., Tarr, M., 1987. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats: 74 cases. *J Am Vet Med Assoc* 190, 1196–1202.
47. Donofrio, G., Franceschi, V., Capocéfalo, A., Cavirani, S., Sheldon, I.M., 2008. Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 65.

48. Donovan P., G.J., 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 414, 92–97.
49. Downing, T.L., Soto, J., Morez, C., Houssin, T., Fritz, A., Yuan, F., Chu, J., Patel, S., Schaffer, D.V., Li, S., 2013. Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat. Mater.* 12, 1154–1162.
50. Durgam SS, Stewart AA, Caporali EH, Karlin WM, S.M., 2009. Effect of tendon-derived progenitor cells on a collagenase-induced model of tendinitis in horses. *Regen Med Suppl* 4.
51. Dzierzak, E., Speck, N.A., 2008. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 9, 129–36.
52. Echeverry, D.M., Rojas, D.M., Aguilera, C.J., Veraguas, D.M., Cabezas, J.G., Rodríguez-Álvarez, L.I., Castro, F.O., 2019. Differentiation and multipotential characteristics of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue of an endangered wild cat (*Leopardus guigna*). *Austral J Vet Sci* 51, 17-26.
53. Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., Hochedlinger, K., 2009. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* 41, 968–976.
54. Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., Chen, K., Li, Y., Liu, X., Xu, J., Zhang, S., Li, F., He, W., Labuda, K., Song, Y., Peterbauer, A., Wolbank, S., Redl, H., Zhong, M., Cai, D., Zeng, L., Pei, D., 2010. Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 6, 71–79.
55. Evans, M., Kaufman, M., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
56. Ezashi, T., Telugu, B., Roberts, R., 2012. Induced pluripotent stem cells from pigs and other ungulate species: An alternative to embryonic stem cells? *Reprod. Domest. Anim.* 47, 92–97.
57. Ezashi, T., Yuan, Y., Roberts, R.M., 2016. Pluripotent Stem Cells from Domesticated Mammals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2016. 4:8.1–8.31
58. Falanga, V., 2012. Stem cells in tissue repair and regeneration. *J Invest Dermatol* 132, 1538–1541.
59. Fan, J., Varshney, R.R., Ren, L., Cai, D., Wang, D.-A., 2009. Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 75–86.

60. Feng, B., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., Ng, H.-H., 2009. Molecules that Promote or Enhance Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 4, 301–312.
61. Filioli Uranio, M., Valentini, L., Lange-Consiglio, A., Caira, M., Guaricci, A., L'Abbate, A., Catacchio, C., Ventura, M., Cremonesi, F., Dell'Aquila, M., 2011. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev* 78, 361–373.
62. Fortier, L., Travis, A., 2011. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res. Ther.* 2, 9.
63. Fu, W.-L., Li, J., Chen, G., Li, Q., Tang, X., Zhang, C.-H., 2015. Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood Retain Their Pluripotency, but Undergo Senescence during Long-Term Culture. *Tissue Eng. - Part C Methods* 21, 1088–1097.
64. Fujishiro, S., Nakano, K., Mizukami, Y., Azami, T., Arai, Y., Matsunari, H., Ishino, R., Nishimura, T., Watanabe, M., Abe, T., Furukawa, Y., Umeyama, K., Yamanaka, S., Ema, M., Nagashima, H., Hanazono, Y., 2012. Generation of Naive-Like Porcine-Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development. *Stem Cells Dev.* 22, 12.
65. Gargett, C.E., Masuda, H., 2010. Adult stem cells in the endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 818–34.
66. Garhyan, J., Bhuyan, S., Pulu, I., Kalita, D., Das, B., Bhatnagar, R., 2015. Preclinical and Clinical Evidence of Mycobacterium tuberculosis Persistence in the Hypoxic Niche of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells after Therapy. *Am. J. Pathol.* 185, 1924–1934.
67. Gattegno-Ho, D., Argyle, S.A., Argyle, D.J., 2012. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *Vet. J.* 191, 19–27.
68. Gómez, M., 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. *Cell. Reprogram.* 17, 376–392.
69. Gómez, M., Serrano, M., CE, P., Jenkins, J., Biancardi, M., López, M., Dumas, C., Galiguis, J., Dresser, B.L., 2010. Derivation of cat embryonic stem-like cells from in vitro-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Ther* 74, 679–688.
70. Gómez, M.C., Pope, C.E., 2014. Stem Cells in Animal Species: From Pre-clinic to Biodiversity 1–185.

71. Gonçalves, N.N., Ambrósio, C.E., Piedrahita, J.A., 2014. Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective. *Reprod. Domest. Anim.* 49 Suppl 4, 2–10.
72. González, J.C., López, C., Carmona, J.U., 2016. Implications of anticoagulants and gender on cell counts and growth factor concentration in platelet-rich plasma and platelet-rich gel supernatants from rabbits. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 29, 115–124.
73. Gould, T.R.L., 1983. Ultrastructural Characteristics of Progenitor Cell Populations in the Periodontal Ligament. *J. Dent. Res.* 62, 873–876.
74. Gurdon, J.B., Melton, D.A., 2008. Nuclear reprogramming in cells. *Science* (80). 322, 1811–1815.
75. Hanna, J., Saha, K., Jaenisch, R., 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508–525.
76. He, Q., Wan, C., Li, G., 2007. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 77, 25:69.
77. Heldin, C., 2013. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun. Signal.* 11, 1–18.
78. Ho, R., Chronis, C., Plath, K., 2011. Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency. *J. Cell Physiol* 226, 868–878.
79. Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., Yamanaka, S., 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135.
80. Horwitz, E.M., 2002. Stem cell plasticity: a new image of the bone marrow stem cell. *Curr Opin Pediatr.* 15, 32–37.
81. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, L.K. et al., 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* (80). 341, 651–654.
82. Hoynowski, S., Fry, M., Gardner, B., Leming, M., Tucker, J., Black, L., Sand, T., Mitchell KE. 2007. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 347–353.
83. Huang, H., Sun, T., Chen, L., Dimitrijevic, M., Moviglia, G., Chernykh, E., Iwatsu, K., 2014. Global clinical neurorestoration in complete chronic spinal cord injury. In *NEUROREPORT* 25, 144–144.



84. Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., Melton, D. a, 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–7.
85. Huss, R., Lange, C., Weissinger, E., Kolb, H., Thalmeier, K., 2000. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34 (-low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 18, 252–260.
86. Iacono E, Cunto M, Zambelli D, R.F., Tazzari PL, M.B., 2012. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for mesenchymal stem cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. *Vet Res Commun* 36, 107–118.
87. Iacono, E., Rossi, B., Merlo, B., 2015. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: An update on their features and clinical application. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 353–364.
88. Im, G.I., Kim, D.Y., Shin, J.H., Hyun, C.W., Cho, W.H., 2001. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J. Bone Joint Surg. Br.* 83, 289–94.
89. Jain, R., Barkauskas, C.E., Takeda, N., Bowie, E.J., Aghajanian, H., Wang, Q., Padmanabhan, A., Manderfield, L.J., Gupta, M., Li, D., Li, L., Trivedi, C.M., Hogan, B.L.M., Epstein, J.A., 2015. Plasticity of Hopx(+) type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nat. Commun.* 6, 6727.
90. Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., Verfaillie, C.M., 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896–904.
91. Jones, P.A., Takai, D., 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068–70.
92. Kadiyala, S., Young, R., Thiede, M., Bruder, S., 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transpl.* 6, 125–134.
93. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294–301.
94. Khanjani, S., Khanmohammadi, M., Zarnani, A.H., Talebi, S., Edalatkhah, H., Eghtesad, S., Nikokar, I., Kazemnejad, S., 2015. Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from menstrual blood-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, E124–E134.

95. Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y., Aryee, M., Lensch, M., 2011. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119.
96. Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D., Betts, D.H., 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 7, 26.
97. Koerner, J., Nestic, D., Romero, J., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., Grogan, S., 2006a. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1613–1619.
98. Koerner, J., Nestic, D., Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan, S., 2006b. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrowderived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1613–1619.
99. Koga, H., Muneta, T., Nagase, T., Nimura, A., Ju, Y.-J., Mochizuki, T., Sekiya, I., 2008. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res.* 333, 207–215.
100. Koh, S., Piedrahita, J., 2014. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals. *Theriogenology* 81, 103–11.
100. Kol, A., Wood, J.A., Carrade Holt, D.D., Gillette, J.A., Bohannon-Worsley, L.K., Puchalski, S.M., Walker, N.J., Clark, K.C., Watson, J.L., Borjesson, D.L., 2015. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther* 6, 73.
101. Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., Tanaka, E.M., 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60–65.
102. Kulesa, H., Frampton, J., Graf, T., 1995. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev.* 9, 1250–1262.
103. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, S.M., Windhager R, Preisegger KH, T.Z., 2007. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 8, 10.
104. Lage-Consiglio, A., Corradetti, B., Bizzaro, D., 2012. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med.* 6, 622–635.

105. Lai, P.-L., Lin, H., Chen, S.-F., Yang, S.-C., Hung, K.-H., Chang, C.-F., Chang, H.-Y., Lu, F.L., Lee, Y.-H., Liu, Y.-C., Huang, H.-C., Lu, J., 2017. Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts. *Sci. Rep.* 7, 1–13.
106. Laiosa, C. V, Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., Graf, T., 2006. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25, 731–44.
107. Lawson, K., Meneses, J., Pedersen, R., 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113, 891–911.
108. Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V.M., Santiago-Osorio, E., &#xf1, ez, V., Manuel, ctor, Santiago-Osorio, E., 2016. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int.* 2016, 1–12.
109. Lee, A.S., Xu, D., Plews, J.R., Nguyen, P.K., Nag, D., Lyons, J.K., Han, L., Hu, S., Lan, F., Liu, J., Huang, M., Narsinh, K.H., Long, C.T., De Almeida, P.E., Levi, B., Kooreman, N., Bangs, C., Pacharinsak, C., Ikeno, F., Yeung, A.C., Gambhir, S.S., Robbins, R.C., Longaker, M.T., Wu, J.C., 2011. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 286, 32697–32704.
110. Lee, J.S., Hong, J.M., Moon, G.J., Lee, P.H., Ahn, Y.H., Bang, O.Y., 2010. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. *Stem Cells* 28, 1099–1106.
111. Letouzey, V., Tan, K.S., Deane, J.A., Ulrich, D., Gurung, S., Ong, Y.R., Gargett, C.E., 2015. Isolation and characterisation of mesenchymal stem/stromal cells in the ovine endometrium. *PLoS One* 10, 1–17.
112. Li, H., Fredriksson, L., Li, X., Eriksson, U., 2003. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene* 22, 1501–1510.
113. Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., Qin, B., Xu, J., Li, W., Yang, J., Gan, Y., Qin, D., Feng, S., Song, H., Yang, D., Zhang, B., Zeng, L., Lai, L., Esteban, M.A., Pei, D., 2010. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51–63.
114. Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., Ding, S., 2009. Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors. *Cell Stem Cell* 4, 370.
115. Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., Ge, J., Liu, C., Zhang, W., Zhang, X., Wu, Y., Li, H., Liu, K., Wu, C., Song, Z., Zhao, Y., Shi, Y., Deng, H., 2011. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* 21, 196–204.

116. Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Lin, X., Hahm, H.S., Hao, E., Hayek, A., 2009. A Chemical Platform for Improved Induction of Human iPS Cells. *Nat Methods* 6, 805–808.
117. Litwiniuk, M., Krejner, A., Grzela, T., 2016. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Blood Cells, Mol. Dis.* 28, 78–88.
118. Ludwig, T.E., Bergendahl, V., Levenstein, M.E., Yu, J., Probasco, M.D., Thomson, J.A., 2006. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 3, 637–46.
119. Lyahyai, J., Mediano, D.R., Ranera, B., Sanz, A., Remacha, A.R., Bolea, R., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martin-Burriel, I., 2012. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet. Res.* 8, 169.
120. Maggio, L., Hoffman, R., Cotter, S.M., Dainiak, N., Mooney, S., Maffei, L. a, 1978. Feline preleukemia: an animal model of human disease. 1978. *Yale J. Biol. Med.* 73, 333–40.
121. Malaver-Ortega, L., Sumer, H., Liu, J., Verma, P., 2012. The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates. *Theriogenology* 78, 1749–62.
122. Mansergh, F., Wride, M., Rancourt, D., 2007. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. *Biochem Cell Biol* 78, 613– 628.
123. Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P., Baker, H.J., 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp. Hematol.* 30, 879–886
124. Martin, G., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS* 78, 7634–7638.
125. Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., Matsubara, Y., Sakuma, T., Satomi, A., Otaki, M., Ryu, J., Mugishima, H., 2008. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* 215, 210–222.
126. Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., Benvenisty, N., 2010. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–31.
127. Megyola, C.M., Gao, Y., Teixeira, A.M., Cheng, J., Heydari, K., Cheng, E.C., Nottoli, T., Krause, D.S., Lu, J., Guo, S., 2013. Dynamic migration and cell–cell interactions of early reprogramming revealed by high-resolution time-lapse imaging. *Stem Cells* 31, 895–905.
128. Meirelles, L., Nardi, N., 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* 123, 702–711.

129. Mendez, M.G., Kojima, S., Goldman, R.D., 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 24, 1838–1851.
130. Merrell, A.J., Stanger, B.Z., 2016. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
131. Miernik, K., & Karasinski, J., 2012. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction* 143, 203–209.
132. Mikkelsen, T., 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.
133. Mitchell, K., Weiss, M., Mitchell, B., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, M.S., 2003. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21, 50–60.
134. Monje, P. V, Soto, J., Bacallao, K., Wood, P.M., 2010. Schwann cell dedifferentiation is independent of mitogenic signaling and uncoupled to proliferation: role of cAMP and JNK in the maintenance of the differentiated state. *J. Biol. Chem.* 285, 31024–36.
135. Morgan, T.H., 1902. Growth and regeneration in *Planaria lugubris*. *Arch. Ent. Mech. Org.* 13, 179–212.
136. Morgani, S., Brickman, J., 2014. The molecular underpinnings of totipotency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369:201305.
137. Mumaw, J.L., Schmiedt, C.W., Breidling, S., Sigmund, A., Norton, N.A., Thoreson, M., Peroni, J.F., Hurley, D.J., 2015. Feline mesenchymal stem cells and supernatant inhibit reactive oxygen species production in cultured feline neutrophils. *Res. Vet. Sci.* 103, 60–69.
138. Musina, R. a, Belyavski, a V, Tarusova, O. V, Solovyova, E. V, Sukhikh, G.T., 2008. from the Menstrual Blood. *Exp. Biol.* 145, 539–543.
139. Nakagawa, N., Duffield, J.S., 2013. Myofibroblasts in Fibrotic Kidneys. *Curr. Pathobiol. Rep.* 1.
140. Nelson, R.W., Reusch, C.E., 2014. Animal models of disease: Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J. Endocrinol.* 222, 1–9. Nerlov, C., Graf, T., 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12, 2403–12.
141. Nichols, J., Smith, A., 2009. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* 4, 487–492.

142. Nie, B., Wang, H., Laurent, T., Ding, S., 2012. Cellular reprogramming: A small molecule perspective. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 784–792.
143. Nowak-imialek, M., Kues, W., Carnwath, J.W., Niemann, H., 2011. Microscopy Microanalysis Pluripotent Stem Cells and Reprogrammed Cells in Farm Animals 474–497.
144. O'Malley, J., Skylaki, S., Iwabuchi, K.A., Chantzoura, E., Ruetz, T., Johnsson, A., Tomlinson, S.R., Linnarsson, S., Kaji, K., 2013. High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. *Nature* 499, 88–91.
145. Parfitt, D.-E., Shen, M.M., 2014. From blastocyst to gastrula: gene regulatory networks of embryonic stem cells and early mouse embryogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369.
146. Park, S.A., Reilly, C.M., Wood, J. a., Chung, D.J., Carrade, D.D., Deremer, S.L., Seraphin, R.L., Clark, K.C., Zwingenberger, A.L., Borjesson, D.L., Hayashi, K., Russell, P., Murphy, C.J., 2013. Safety and immunomodulatory effects of allogeneic canine adipose-derived mesenchymal stromal cells transplanted into the region of the lacrimal gland, the gland of the third eyelid and the knee joint. *Cytherapy* 15, 1498–1510.
147. Passeri, S. et al, 2009. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int* 33, 100–105.
148. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Bjorklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., Parmar, M., 2011. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 10343–10348.
149. Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., 2012. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151, 1617–1632.
150. Pontius, J.U., Mullikin, J.C., Smith, D.R., Lindblad-Toh, K., Gnerre, S., Clamp, M., Chang, J., Stephens, R., Neelam, B., Volfovsky, N., Schäffer, A. a., Agarwala, R., Narfström, K., Murphy, W.J., Giger, U., Roca, A.L., Antunes, A., Menotti-Raymond, M., Yuhki, N., Pecon-Slattery, J., Johnson, W.E., Bourque, G., Tesler, G., O'Brien, S.J., Brand, A., Ebling, H., Saranga, D.J., Rubenfield, M., Parisi, M.J., Tao, W., Tusneem, N., David, R., Gustafson, E., Tsolas, J., McKernan, K., 2007. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.* 17, 1675–1689.
151. Prockop, D., Gregory, C., Spees, J., 2003. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11917– 11923.

152. Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J., Srivastava, D., 2012. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485, 593–598.
153. 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. *Vet. J.* 204, 241–246.
154. Quimby, J.M., Webb, T.L., Habenicht, L.M., Dow, S.W., 2013. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 48.
155. Quimby, J.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. *J. Feline Med. Surg.* 1–7.
156. Reed, S.A., Johnson, S.E., 2008. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J. Cell. Physiol.* 215, 329–336.
157. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, A.S., 2009. Comparison of canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med* 4, 6.
158. Ring, K.L., Tong, L.M., Balestra, M.E., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., Li, G., Walker, D., Zhang, W.R., Kreitzer, A.C., Huang, Y., 2012. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* 11, 100–109.
159. Ringe, J., Kaps, C., Schmitt, B., Buscher, K., Bartel J, Smolian H, Schultz O, B.G., Haupl T, S.M. (2002), 2002a. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 307, 321–327.
160. Ringe, J., Kaps, C., Schmitt, B., Buscher, K., Bartel, J., Smolian, H., Schultz, O., Burmester, G., Haupl, T., Sittinger, M., 2002b. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 307, 321–327.
161. Ryan, J., Barry, F., Murphy, J., Mahon, B., 2005a. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2, 8.
162. Ryan, J., Barry, F., Murphy, J., Mahon, B., 2005b. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2, 8.



163. Ryu, K., Cho, K., Park, H., Kim, J., Woo, S., Jo, I., Choi, Y., Park, Y., Jung, S., Chung, S., Choi, B., Kim, H., 2012. Tonsil-derived mesenchymal stromal cells: Evaluation of biologic, immunologic and genetic factors for successful banking. *Cytotherapy* 14, 1193–1202.
164. Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T., 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52, 2521–2529.
165. Sakurai, K., Talukdar, I., Patil, V.S., Dang, J., Li, Z., Chang, K.Y., Lu, C.C., Delorme-Walker, V., DerMardirossian, C., Anderson, K., 2014. Kinome-wide functional analysis highlights the role of cytoskeletal remodeling in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 14, 523–534.
166. Samavarchi-Tehrani, P. Golipour, A., David, L., Sung, H.K., T.A., B., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., Wrana, J.L., 2010. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7, 64–77.
167. Sancho-Martinez, I., Ocampo, A., Izpisua Belmonte, J.C., 2014. Reprogramming by lineage specifiers: blurring the lines between pluripotency and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 28, 57–63.
168. Sartori, C., DiDomenico, A.I., Thomson, A.J., Milne, E., Lillico, S.G., Burdon, T.G., Whitelaw, C.B. a, 2012. Ovine-induced pluripotent stem cells can contribute to chimeric lambs. *Cell. Reprogram.* 14, 8–19.
169. Sato, K., Yamawaki-Ogata, A., Kanemoto, I., Usui, A., Narita, Y., 2016. Isolation and characterisation of peripheral blood-derived feline mesenchymal stem cells. *Vet. Journal.* 216, 183–188.
170. Sehwon, K., Piedrahita, J., 2014. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals. *Theriogenology* 81, 103–11.
171. Shi, Y., 2007. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 8, 829–833.
172. Siebelink, K., Chu, I., Guss, F., 1990. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV-induced impairment of immune function. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6, 1373–1378.
173. Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., Smith, A., 2009. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722–737.
174. Singh, J., Mann, A., Kumar, D., Duhan, J., Yadav, P., 2013. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent mesenchymal stem cells. *Vitr. Cell Dev Biol Anim* 49, 408–416.

175. Slack, J.M.W., 2007. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 369–78.
176. Smith, R., Korda, M., Blunn, G., Goodship, A., 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35, 99–102.
177. Sreekumar, T., Ansari, M., Chandra, V., Sharma, G., 2014. Isolation and characterization of buffalo Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells. *J Stem Cell Res Ther* 4.
178. Stadtfeld, M., Hochedlinger, K., 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239–2263.
179. Staszuk C, Mensing N, Hambruch N, Ha"nger J-D, Pfarrer C, G.H., 2009. Equine periodontal ligament: a source of mesenchymal stem cells for regenerative therapies in the horse? In: World Conference on Regenerative Medicine. *Regen Med Suppl* 4.
180. Stewart A, Chen YJ, Caporali EH, S.A., 2009. Isolation and chondrogenic differentiation of cells isolated from equine synovial fluid. In: World Conference on Regenerative. Med. *Regen Med Suppl* 4.
181. Streckfuss-Bomeke, K., Wolf, F., Azizian, A., Stauske, M., Tiburcy, M., Wagner, S., Hubscher, D., Dressel, R., Chen, S., Jende, J., Wulf, G., Lorenz, V., Schon, M.P., Maier, L.S., Zimmermann, W.H., Hasenfuss, G., Guan, K., 2013. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur. Heart J.* 34, 2618–2629.
182. Sumer, H., Liu, J., Malaver-Ortega, L.F., Lim, M.L., Khodadadi, K., Verma, P.J., 2011. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J. Anim. Sci.* 89, 2708–2716.
183. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
184. Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–76.
185. Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler, W.E., Wakefield, L., Wilson, E.M., Finegold, M.J., Grompe, M., 2014. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 15, 605–18.
186. Tata, P.R., Mou, H., Pardo-Saganta, A., Zhao, R., Prabhu, M., Law, B.M., Vinarsky, V., Cho, J.L., Breton, S., Sahay, A., Medoff, B.D., Rajagopal, J., 2013. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature* 503, 218–23.

187. Tatullo, M., Marrelli, M., Paduano, F., 2015. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int. J. Med. Sci.* 12, 72–7.
188. Theunissen, T.W., Van Oosten, A.L., Castelo-Branco, G., Hall, J., Smith, A., Silva, J.C.R., 2011. Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions. *Curr. Biol.* 21, 65–71.
189. Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80). 282, 1145–1147.
190. Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., Herrera, P.L., 2010. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464, 1149–54.
191. Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J.L., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 3, 778–784.
192. Tosh, D., Slack, J., 2002. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 187–194.
193. Trokovic, R., Weltner, J., Noisa, P., Raivio, T., Otonkoski, T., 2015. Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 15, 254–262.
194. Tropel, P., Noël, D., Platet, N., Legrand, P., Benabid, A.L., Berger, F., 2004. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.* 295, 395–406.
195. Tsai, C.C., Su, P.F., Huang, Y.F., Yew, T.L., Hung, S.C., 2012. Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Mol. Cell* 47, 169–182.
196. Valenti, M., Dalle Carbonare, L., Donatelli, L., Bertoldo, F., Zanatta, M., Cascio, L., 2008. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone* 43, 1084–1092.
197. Veraguas, D., Gallegos, P.F., Castro, F.O., Rodriguez-Alvarez, L., 2017. Cell cycle synchronization and analysis of apoptosis-related gene in skin fibroblasts from domestic cat (*Felis silvestris catus*) and kodkod (*Leopardus guigna*). *Reprod. Domest. Anim.* 52, 881–889.
198. Verma, R., Liu, J., Holland, M.K., Temple-Smith, P., Williamson, M., Verma, P.J., 2013. Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *Biores. Open Access* 2, 72–6.

199. Vidal, M., Kilroy, G., Johnson, J., Lopez, M., Moore, R., Gimble, J., 2006. Cell Growth Characteristics and Differentiation Frequency of Adherent Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity. *Vet. Surg.* 35, 601–610.
200. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, G.J., 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.
201. Vidane, A.S., Souza, A.F., Sampaio, R. V, Bressan, F.F., Pieri, N.C., Martins, D.S., Meirelles, F. V, Miglino, M. a, Ambrósio, C.E., 2014. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. *Stem Cells Cloning* 7, 71–8.
202. Villanueva, A., Alsinet, C., Yanger, K., Hoshida, Y., Zong, Y., Toffanin, S., Rodriguez-Carunchio, L., Solé, M., Thung, S., Stanger, B.Z., Llovet, J.M., 2012. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology* 143, 1660–1669.e7.
203. Visvader, J.E., Elefanty, A.G., Strasser, A., Adams, J.M., 1992. GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *EMBO J.* 11, 4557–64.
204. Wagers, A., 2004. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* 116, 639–648.
205. Wang, B., Miyagoe-Suzuki, Y., Yada, E., Ito, N., Nishiyama, T., Nakamura, M., Ono, Y., Motohashi, N., Segawa, M., Masuda, S., Takeda, S., 2011. Reprogramming efficiency and quality of induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages. *PLoS Curr.* 3,
206. Warhonowicz, M., Staszuk, C., Rohn, K., Gasse, H., 2006. The equine periodontium as a continuously remodeling system: Morphometrical analysis of cell proliferation. *Arch. Oral Biol.* 51, 1141–1149.
207. Webb, T.L., Webb, C.B., 2015. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *J. Feline Med. Surg.* 17, 901–908.
208. Weissbein, U., Ben-David, U., Benvenisty, N., 2014. Virtual karyotyping reveals greater chromosomal stability in neural cells derived by transdifferentiation than those from stem cells. *Cell Stem Cell* 15, 687–691.
209. West, F.D., Uhl, E.W., Liu, Y., Stowe, H., Lu, Y., Yu, P., Gallegos-Cardenas, A., Pratt, S.L., Stice, S.L., 2011. Brief report: Chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs. *Stem Cells* 29, 1640–1643.
210. Willet, BJ, Flynn, J., Hosie, M., 1997. FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS. *Immunol Today* 18, 182–189.

211. Williams, R., Hilton, D., Pease, S., Willson, T., Stewart, C., 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684–687.
212. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–3.
213. Wood, J., Chung, D., Park, S., Zwingenberger, A., Reilly, C., Ly, I., Walker, N., Vernau, W., Hayashi, K., Wisner, E., Cannon, M., Kass, P., Cherry, S., Borjesson, D., Russell, P.C., Murphy, C., 2012. Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: An In Vivo Imaging and Migration Study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 28, 307–317.
214. Xie, H., Ye, M., Feng, R., Graf, T., 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117, 663–76.
215. Yamakawa, H., Muraoka, N., Miyamoto, K., Sadahiro, T., Isomi, M., Haginiwa, S., Kojima, H., Umei, T., Akiyama, M., Kuishi, Y., Kurokawa, J., Furukawa, T., Fukuda, K., Ieda, M., 2015. Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Cardiac Reprogramming under Defined Conditions. *Stem Cell Reports* 5, 1128–1142.
216. Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R.S., Shi, S., Huang, G.T.-J., 2010. iPS Cells Reprogrammed From Human Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells Dev.* 19, 469–480.
217. Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 14, 818–29.
218. Yanger, K., Stanger, B.Z., 2014. Liver cell reprogramming: parallels with iPSC biology. *Cell Cycle* 13, 1211–2.
219. Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L.R., Shapira, S.N., Maddipati, R., Aiello, N.M., Thung, S.N., Wells, R.G., Greenbaum, L.E., Stanger, B.Z., 2013. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev.* 27, 719–24.
220. Ying, Q., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen P, S.A., 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519–523.
221. Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., Sekiya, I., 2007. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327, 449–462.
222. Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., Sekiya, I., 2007a. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327, 449–462.

223. Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., Sekiya, I., 2007b. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327, 449–462.
224. Yu, C., Liu, K., Tang, S., Ding, S., 2014. Chemical approaches to cell reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 28C, 50–56.
225. Yu, X., Jin, G., Yin, X., Cho, S., Jeon, J., Lee, S., Kong, I., 2008. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo-produced cat blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1426–32.
226. Yuan, X., Wan, H., Zhao, X., Zhu, S., Zhou, Q., Ding, S., 2011. Brief Report: Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts. *Stem Cells* 29, 549–553.
227. Zhang, J., Wang, J.H.C., 2010. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am. J. Sports Med.* 38, 2477–2486.
228. Zhao, Y., 2008. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 3, 475–479.
229. Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., Stanger, B.Z., 2009. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 136, 1727–39.

