



“OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO PARA SU APLICACIÓN EN TERAPIAS REGENERATIVAS EN AVES DE INTERÉS DE CONSERVACIÓN”.

Tesis de licenciatura
para optar por el título de

Licenciada en Biotecnología

de la

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

ESCUELA DE BIO Y NANOTECNOLOGÍAS

Presentación por

Francesca Tiziana Pérez Profeta

Directora: Dra. Micaela Navarro

Co-directores: Dr. Adrián Mutto y Lic. Adrián Sestelo.

Lugares de trabajo:

Laboratorio de Biotecnologías Aplicadas a la Reproducción y Mejoramiento Genético Animal. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde” (IIBIO). Localidad de General San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Laboratorio de Biotecnología Reproductiva para la conservación Animal del Ecoparque Interactivo de Buenos Aires. Capital Federal, Argentina.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia,

A mi marido por incentivar-me a seguir por más,

A mi papá por sembrarme la curiosidad y a mi mamá por enseñarme la disciplina,

A mi hermana por darle una salpicada de creatividad y pancakes a mis estudios,

A mis abuelos que me prendieron velitas para cada examen desde acá y desde arriba,

A mis tíos por coparse en debates sobre biología,

A Mili y Marian que los conocí en el curso de ingreso a la UNSAM hace 7 años y es el día de hoy que siguen siendo mis amigos invaluable,

A mis amigas del colegio May, Belu, Juani, Betsi, Agus S, Agus MT y Celes que estuvieron a mi lado desde siempre,

A mis compañeros y amigos de la facultad por el apoyo mutuo y colectivo, especialmente a Ari, Maxi, Joel, Dan, Aldi, Ivi, Male, Rama, Cami y Coti con los que compartí risas, estrés, resúmenes y muchos (muchos) mates.

A mis profesores a lo largo de la carrera, que no solo mantuvieron sino que aumentaron mi pasión por esta ciencia,

A Pau Ruybal, Kenita Risso y Picho Repetto de Facultad de Medicina de la UBA por enseñarme por primera vez cómo es trabajar en un laboratorio de investigación y por sembrar el interés de continuar en la academia,

A la gente del Mutto lab: mi mentora Mica Navarro que me enseñó y acompañó desde el comienzo para la realización de esta tesis con dedicación y paciencia, guiándome desde cerca y desde lejos. A Adri Mutto por el apoyo, a Caro Blugermann por sus tips super valorados y a Lu, Mechi, Lucre, y Caro por los bellos momentos compartidos,

A Adrián Sestelo y Belu Ceballos del Ecoparque, que me hicieron parte de su equipo rápidamente, me apoyaron en todas, me enseñaron y me demostraron la importancia de la conservación de las especies silvestres con todo lo que ello conlleva,

A la comisión de tesinas, y a la UNSAM,

¡Muchas gracias!

Resumen

Las células madre mesenquimales son células madre adultas que pueden originar principalmente derivados de la línea mesodérmica, como osteocitos, adipocitos y condrocitos. En numerosas especies, estas células han sido aisladas de múltiples tejidos como médula ósea, cordón umbilical, tejido muscular, tejido adiposo, líquido sinovial, entre otros, y han sido aplicadas en la clínica tanto humana como veterinaria para tratar distintas patologías, entre las cuales resaltan las lesiones articulares y óseas.

En pollos, sólo hay unos pocos informes que hayan logrado aislar células madre mesenquimales de tejido adiposo (AdMSC), mientras que no hay informes disponibles en especies de aves silvestres. Al día de la fecha, aún no existen terapias celulares regenerativas que puedan ser aplicadas en aves para tratar lesiones articulares u óseas. Por lo tanto, en este trabajo, el objetivo consistió en aislar, cultivar y caracterizar AdMSC de especies de aves con el fin de proporcionar un punto de partida para el desarrollo de terapias celulares regenerativas y contribuir a la conservación de la vida silvestre.

Durante este trabajo, se logró optimizar la extracción de AdMSC para obtener un cultivo estable a partir de la menor cantidad de grasa posible. Se desarrolló el método de “explantos digeridos enzimáticamente de manera parcial” el cual permitió obtener AdMSC de hasta 0,02 g de tejido adiposo, lo cual es sumamente relevante al tener como objetivo la obtención de muestra a través de cirugías mínimamente invasivas en aves silvestres de interés de conservación. Mediante la digestión del tejido adiposo, se lograron obtener AdMSC de pollos (*Gallus gallus domesticus*) y de aves silvestres como *Pavo cristatus*, *Parabuteo unicinctus* y *Buteogallus coronatus* las cuales mostraron una morfología de crecimiento tipo fibroblastoide, característica de las células madre mesenquimales. A continuación, se probaron diferentes medios de cultivo basales para determinar las condiciones que más favorecían la proliferación celular en función del tiempo. Mediante el cálculo del tiempo de duplicación de la población, se observó que las células presentaron una mayor velocidad de crecimiento cuando eran cultivadas en presencia de medios ricos y complejos como es el DMEM F12 en comparación con medios más simples como el DMEM con alto o bajo contenido

de glucosa. Habiendo logrado aislar AdMSC de distintos ejemplares de aves, el siguiente paso consistió en evaluar su perfil molecular y capacidad de diferenciación para confirmar la identidad de las células. Mediante retrotranscripción y PCR a punto final, se corroboró que las células expresaban marcadores específicos de células madre como *cd29*, *cd44* y *cd90*, mientras que no expresaban el marcador hematopoyético *cd34*, demostrando que las células obtenidas poseían el perfil molecular descrito para células madre mesenquimales. Finalmente, utilizando factores de crecimiento e inhibidores específicos, se observó que las AdMSC eran capaces de diferenciarse en osteocitos, adipocitos y condrocitos, confirmando su multipotencia. La morfología de crecimiento, el perfil molecular y la capacidad multipotente no mostraron alteraciones luego de múltiples pasajes *in vitro* (+10), indicando un fenotipo celular estable bajo las condiciones de cultivo empleadas.

Estos hallazgos resaltan, por primera vez, el aislamiento y cultivo *in vitro* optimizado de AdMSC de *Gallus gallus domesticus*, *Pavo cristatus*, *Parabuteo unicinctus* y *Buteogallus coronatus* lo que permitirá confeccionar un biobanco de células madre mesenquimales de estas especies que, en última instancia, podrán ser empleadas como principio activo en terapias de regeneración tisular.

Índice

Resumen.....	2
Abreviaturas.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Células madre.....	7
1.2 Células madre multipotentes.....	10
1.3 Células madre mesenquimales.....	12
1.3.1 MSC de tejido adiposo.....	14
1.4 Células madre mesenquimales y su relevancia en medicina regenerativa.....	17
1.4.1 Regeneración ósea.....	17
1.4.2 Regeneración de cartílago.....	19
1.4.3 Tratamiento de otras afecciones.....	20
1.4.4 Nuevo enfoque: MSC y su potencial para la conservación de especies.....	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
2.1 Hipótesis.....	26
2.2 Objetivo general.....	26
2.3 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Aislamiento y cultivo in vitro de AdMSC.....	28
3.3 Evaluación de distintos medios de cultivo basales y determinación del tiempo de duplicación celular.....	30
3.4 Extracción del ARN total, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a punto final.....	31
3.5 Inducción de la diferenciación celular a osteocitos, condrocitos y adipocitos.....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Aislamiento de AdMSC de pollos.....	36
4.2 Evaluación de medios basales para optimizar el crecimiento de AdMSC de pollos.....	38
4.3 Evaluación de marcadores moleculares específicos de AdMSC de pollo.....	39
4.4 Inducción de la diferenciación de AdMSC de pollo.....	41
4.5 Aislamiento, cultivo in vitro y diferenciación de AdMSC de aves silvestres.....	44
4.5.1 Águila coronada.....	48
4.6 Confección de biobanco de AdMSC de aves silvestres.....	50
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	61

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

AdMSC: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

AdMSCb: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de bovinos.

AdMSCp: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de pollos.

ARN: ácido ribonucleico.

DMEM: *Dulbecco Minimum Essential Medium*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPBS: *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*.

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina.

IFN- γ : interferón gamma

IL- β : interleuquina β

ITS: insulina-transferrina-selenio

MEM NEAA: medio esencial mínimo de *Eagle* con aminoácidos no esenciales.

MSC: células madre mesenquimales.

N/A: no aplica.

PDT: factor de tiempo de duplicación de población.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a punto final.

RT: retrotranscripción.

SFB: suero fetal bovino.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TNF α : factor de necrosis tumoral

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Células madre

En el año 1868, Ernst Haeckel introdujo el nombre de *Stammzelle* (o “célula madre” en español) para referirse a un ancestro unicelular del cual todos los organismos multicelulares evolucionamos. Este concepto ya quedó obsoleto, pero el mismo Haeckel empleó su nombre para referirse más tarde a los óvulos fecundados, también llamados cigotos (Cotovio y col., 2020). El término “célula madre” (del inglés “*stem cell*”) deriva de allí. Las células madre se definen como células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovarse (dar origen a células hijas iguales a su progenitora) y de producir progenie especializada a través del proceso de diferenciación celular (Weissman y col., 2001). En el año 2013, Shahriyani y col., propusieron dos modelos para explicar la división celular de una célula madre: el simétrico y el asimétrico (Shahriyani y col., 2013). En el modelo de división simétrico, una célula madre produce dos células madre indiferenciadas o dos células diferenciadas; mientras que en el modelo asimétrico, una célula madre produce una célula indiferenciada y una diferenciada (Fig. 1).

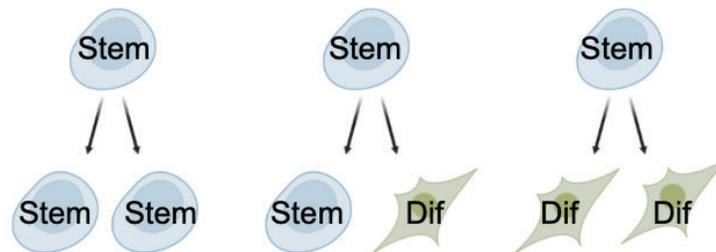


Figura 1: Modelo propuesto por Shahriyani y col., para explicar la división de las células madre. Las células madre (Stem) pueden dar origen a una progenie idéntica a ellas, haciendo referencia al proceso de autorenovación, o pueden dar origen a células diferenciadas (Dif). Como resultado de la división celular, las células hijas pueden ser iguales entre ellas (modelo simétrico) o diferentes (modelo asimétrico).

Desde la formación del cigoto hasta incluso durante la vida adulta de un organismo, las células madre sufren constantes cambios en su identidad, los cuales están principalmente dados por factores de transcripción y modificaciones epigenéticas (Chen y col., 2010). Debido a esto, durante

el desarrollo, la capacidad de diferenciación de las células se va restringiendo, siendo las células madre que conforman a un embrión capaces de producir derivados que incluyen a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios; mientras que a medida que avanza el desarrollo, las células madre alcanzan un estado de diferenciación final en el cual permanecen con la identidad de un tipo celular en particular. Para describir la relación entre la dinámica del desarrollo y el proceso de diferenciación celular, Conrad Waddington publicó en el año 1957 (Waddington., 1957) su famoso dibujo en el cual las células eran esquematizadas como pelotas bajando por una colina en un paisaje de valles y montañas (Fig. 2). Allí, las células (representadas como pelotas) descienden desde la cima, lugar en donde reposan en un estado indiferenciado, hasta detenerse en los valles, lugar en donde se restringe su capacidad de diferenciación. De esta forma, cada valle representa un posible destino celular donde la célula puede reposar de manera diferenciada, y las montañas que encierran a ese valle mantienen el destino de la célula una vez que es elegido. Además, a medida que descienden por la colina, las células pueden autorrenovarse.

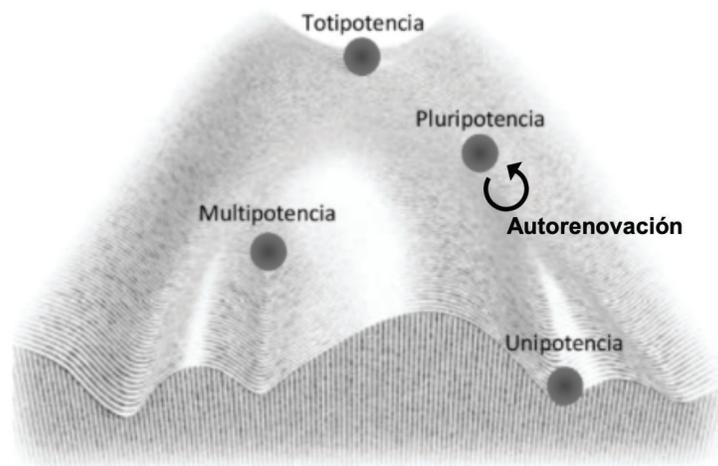


Figura 2: Ilustración adaptada de la topografía de Waddington que hace analogía a la plasticidad del destino celular.

Es así entonces que las células madre son clasificadas según su capacidad de autorrenovación, su clonalidad y su potencia. Los términos “autorrenovación y clonalidad” se refieren a que una célula madre es capaz de dividirse un gran número de veces sin sufrir alteraciones genéticas y evitando así mutaciones potencialmente oncogénicas. Por otro lado, la potencialidad,

hace referencia a la cantidad de tipos celulares a los que las células pueden dar origen tras su replicación (Weissman y col., 2001; W. Zakrzewski y col., 2019). De esta forma, según su grado de potencia, las células madre se clasifican en:

Totipotentes: capaces de dividirse y diferenciarse en todos los tipos celulares necesarios para dar origen a un organismo completo. Dan origen a tejidos embrionarios y extraembrionarios. Desde la formación del cigoto hasta el estadio de mórula, las células que conforman al embrión son consideradas totipotenciales. Considerando la topografía de Waddington, estas células estarían ubicadas en la cima de la colina.

Pluripotentes: capaces de originar cualquiera de las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo) pero incapaces de originar tejido extraembrionario. Estas células, también llamadas células madre embrionarias, pueden encontrarse en el macizo celular interno de blastocistos en estadios preimplantatorios.

Multipotentes: estas células pueden dar origen a células de un linaje específico, por lo que producen un menor espectro de células diferenciadas en comparación con las pluripotentes. Estas células pueden ser aisladas de distintos tejidos de organismos fetales y adultos. Algunos ejemplos involucran a las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales, las cuales únicamente pueden producir derivados de células sanguíneas o mesodérmicas, respectivamente.

Unipotentes: son capaces de originar un sólo tipo celular de un linaje determinado, por lo que son consideradas las de menor potencialidad. Considerando la topografía de Waddington, estas células estarían ubicadas en la base de la colina. Un ejemplo son las espermatogonias (células madre espermáticas), que únicamente pueden diferenciarse a espermatozoides.

Debido a su alta capacidad proliferativa y potencial de diferenciación, las células madre son consideradas como excelentes herramientas para su uso en medicina regenerativa, testeado de drogas,

modelo de estudio del desarrollo y modelado de enfermedades (Palma., 2001). Sin embargo, es importante evaluar qué tipo de célula madre es la mejor candidata para cada aplicación de interés. Por ejemplo, las células madre totipotentes y pluripotentes, rara vez han sido utilizadas en medicina regenerativa debido al potencial riesgo tumorigénico que presentan y a que su obtención involucra problemas éticos asociados con la destrucción de embriones. Por esta razón, y en medicina regenerativa en particular, es que las células madre multipotentes cobran mayor protagonismo debido a que las mismas reducen el riesgo tumorigénico, se pueden obtener de organismos adultos y conservan la capacidad de originar más de un tipo de tejido. Debido a las ventajas que las células madre multipotentes presentan, es que en esta tesis se las eligió para desarrollar terapias celulares con el fin de promover la regeneración tisular en aves.

1.2 Células madre multipotentes

Las primeras células madre multipotentes fueron identificadas en el año 1961 por James Till y Ernest McCulloch, cuando se encontraban estudiando los efectos de la radiación sobre la médula ósea de ratones. Los autores notaron que había una población celular proveniente del tejido hematopoyético que era capaz de originar colonias con múltiples linajes celulares cuando se las transplantaba en ratones previamente irradiados (Till y col., 1963). De esta forma, se descubrieron a las células madre multipotentes, también llamadas células madre adultas, células madre somáticas, células madre tisulares o residentes; las cuales pueden ser obtenidas de organismos en estadio fetal o adulto, y si bien tienen un potencial de diferenciación más limitado en comparación con células madre totipotentes y pluripotentes, las mismas pueden originar numerosos tejidos dentro de un mismo linaje celular (Richard L. Gardner., 2009).

Actualmente, el origen de las células madre adultas continúa sin estar completamente comprendido. Se asume que las células madre multipotentes escapan a la especificación hacia un determinado linaje durante el desarrollo embrionario y pasan a conformar nichos especializados en tejidos del individuo, manteniendo su potencia y permitiendo el recambio celular para asegurar la homeostasis de uno o varios tejidos (Fig. 3) (Richard L. Gardner., 2009). Estos nichos de células madre son microambientes vasculares especializados y dinámicos que pueden no tener una

ubicación fisiológica discreta. Su función surge de la comunicación entre células madre y células vecinas, componentes de la matriz extracelular, gradientes químicos locales, temperatura, presión de oxígeno, y otras señales bioquímicas que proveen a las células madre de señales intrínsecas y extrínsecas para regular su destino celular y su autorenovación. Lo anterior explica por qué las células madre adultas se comportan distinto al resto de las células somáticas del tejido que residen (Regenerative Medicine, 2011, p 401-408; Ferraro y col., 2014; Schofield., 1978; Kurenkova y col., 2020). Un ejemplo de nicho es el de células madre hematopoyéticas el cual contiene células estromales, endoteliales y nerviosas, y recibe señales de osteoblastos, macrófagos y megacariocitos. La diferenciación de las células madre hematopoyéticas hacia el linaje mieloide o linfoide está determinado por las señales bioquímicas reguladas por el nicho donde se encuentran (Kurenjova y col., 2020).

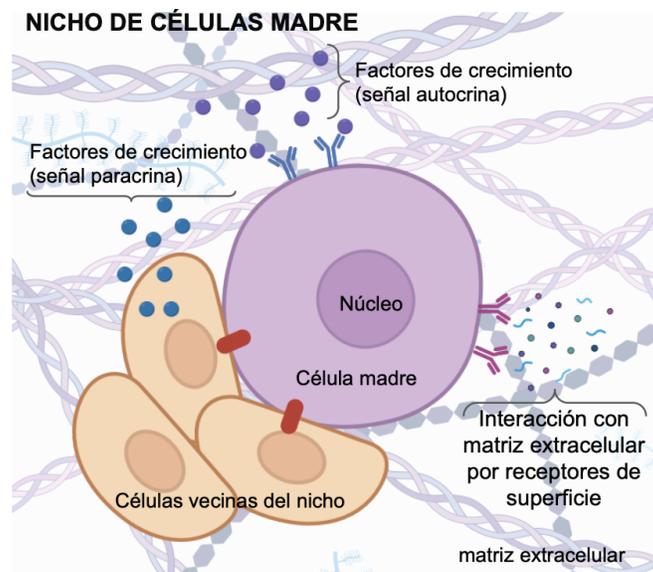


Figura 3: Nicho de Células Madre. Las células madre interactúan con las células del nicho y la matriz extracelular. Las células madre pueden recibir señales paracrinas y autocrinas que guían su destino celular y autorenovación. Figura adaptada de Clark y col., 2016.

En un individuo, los nichos para un mismo tipo de célula madre pueden encontrarse en una amplia variedad de tejidos, donde cada tejido posee condiciones fisiológicas distintas. Es así como un mismo tipo de célula madre puede exhibir un perfil molecular distinto dependiendo del

tejido donde se encuentre, al estar sometidas a diversas condiciones ambientales (Ferraro y col., 2014). Aún así, se han identificado ciertas características compartidas dentro del mismo linaje de célula madre, independientemente del tejido donde se encuentre, pudiendo confeccionar un perfil molecular específico. A partir de lo anterior es que se ha establecido un perfil fenotípico de algunas células madre adultas multipotentes (Essentials of Stem Cell Biology, 2nd Edition, 2009, capítulo 1), entre las cuales se incluyen a las células madre mesenquimales, como se detalla a continuación.

1.3 Células madre mesenquimales

En el año 1968, Friedenstein y colaboradores describieron por primera vez a las células madre mesenquimales (MSC) luego de haber extraído células de aspecto fibroblastoide provenientes de médula ósea, capaces de replicarse de manera clonal y de diferenciarse *in vitro* para dar origen a células con morfologías semejantes a células de músculo, cartílago, hueso y de tejido conectivo (Friedenstein y col., 1968).

Las células madre mesenquimales son células madre multipotentes adultas que, como su nombre lo indica, se pueden encontrar esencialmente en cualquier tejido derivado del mesodermo. Al día de la fecha, hay reportes que han logrado aislar MSC de especies como humanos, roedores, rumiantes, entre otros (Harness y col., 2022), a partir de estadios fetales y adultos. Las MSC pueden encontrarse en una amplia variedad de tejidos entre los cuales se encuentran: médula ósea, tejido adiposo, tejido endometrial, cordón umbilical, placenta, líquido sinovial, músculo, pulpa dental, testículos, etc., y año a año se continúan encontrando nuevas fuentes de MSC (Dah-Ching y col., 2011; Kozłowska y col., 2019; Hmadcha y col., 2020;). En todos los casos, las MSC obtenidas pueden ser diferenciadas a varios tejidos del mesodermo, como células de hueso, grasa y cartílago; aunque bajo condiciones específicas de cultivo *in vitro*, también se ha logrado obtener derivados de ectodermo y endodermo tal como células neuronales y hepáticas (Dah-Ching y col., 2011). Una vez obtenidas, las MSC pueden ser cultivadas *in vitro* utilizando componentes similares a los que se utilizan para el cultivo de células somáticas como DMEM y suero fetal. Sin embargo, poseen ciertas características que las diferencian de las células somáticas, como la expresión de determinadas

proteínas de superficie y su capacidad de diferenciación a distintos tipos celulares bajo estímulos específicos. Si bien existen ciertas diferencias en el perfil de expresión de las MSC dependiendo del tejido de donde se las obtiene (Kern y col., 2006; Kozłowska y col., 2019), en todos los casos, las mismas deben exhibir las siguientes características determinadas por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici y col., 2016):

- Poseer un patrón de crecimiento *in vitro* en adherencia y con morfología tipo fibroblastoide.
- Deben expresar marcadores específicos de superficie como *cd73*, *cd105*, *cd29*, *cd90*, *cd44* y *cd166*, y no expresar *cd45*, *cd34*, *cd31*.
- Deben poder diferenciarse a distintos linajes bajo condiciones de cultivo específicas, principalmente a tejidos como hueso, cartílago y grasa (Dah-Ching y col., 2011, Lee y col., 2016, Kern y col., 2006).

Actualmente, las MSC están siendo ampliamente estudiadas para su aplicación en terapias celulares debido a su potencial de diferenciación, y a sus propiedades inmunomoduladoras. Existe evidencia de que la fuente de obtención de MSC juega un rol muy importante en su potencial regenerativo e inmunomodulatorio, debido a que dependiendo del tejido del cual derivan, las MSC pueden reaccionar de manera diferencial a estímulos como drogas y/o citoquinas tales como interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF α) e interleuquina β (IL- β) (Dazzi y col., 2011). A su vez, se debe tener en cuenta que la fuente de obtención que se elija debe estar disponible, que involucre un proceso de obtención mínimamente invasivo, y que sea adecuada para la terapia celular que se desea desarrollar. Los tejidos más frecuentemente utilizados para la obtención de MSC y posterior aplicación en terapias regenerativas son la médula ósea, el tejido adiposo y el cordón umbilical (Blaž y col., 2020). Sin embargo, dado que el cordón umbilical es una fuente no conveniente para desarrollar terapias autólogas (tratamientos celulares con células provenientes del mismo individuo), y que la obtención de médula ósea involucra procedimientos invasivos y dolorosos para el paciente, es que el tejido adiposo constituye una herramienta accesible y poco invasiva para utilizarlo como fuente de MSC para su aplicación en medicina regenerativa.

1.3.1 MSC de tejido adiposo

El tejido adiposo está constituido por numerosos tipos celulares envueltos en una matriz de colágeno. Los adipocitos son el tipo celular más abundante, siendo los encargados del almacenamiento de ácidos grasos, luego le siguen los pre-adipocitos que comunican a los adipocitos con los macrófagos residentes del tejido, y por último se encuentran fibroblastos, células endoteliales y células madre mesenquimales. Cada uno de estos tipos celulares juegan un rol en las diferentes vías metabólicas así como también en la coagulación y en procesos inflamatorios (Dashty y col., 2014).

El tejido adiposo posee generalmente alta viscosidad, aunque existen variaciones según la especie y del sitio del cual se obtiene. Elegir un método de extracción apropiado es un paso crítico para la obtención de células con un buen rendimiento (Hendijani., 2017). Generalmente, el método de gradiente de Ficoll es frecuentemente utilizado para el aislamiento de MSC de tejidos como la médula ósea, sin embargo, debido a la textura del tejido adiposo, este método no arroja buenos rendimientos (Ferrin y col., 2017). Por lo tanto, para poder disgregar el tejido adiposo y permitir la obtención de células se utilizan los siguientes métodos:

- **Digestión enzimática:** consiste en emplear enzimas como las de la familia de colagenasas, las cuales son proteasa que rompe el enlace entre un aminoácido neutral (X) y glicina en la secuencia Pro-X-Gly-Pro, que se encuentra con alta frecuencia en el colágeno, el cual conforma a la matriz extracelular del tejido adiposo. La desagregación con colagenasa produce la disociación de las células a temperatura y pH fisiológicos, y no requiere agitación mecánica ni equipos especiales. Existen distintos tipos de colagenasa, diferenciándose por los sitios de ruptura enzimática, pero la colagenasa I y IV son las más utilizadas para disgregar tejido adiposo (Gong y col., 2011).
- **Cultivo de explantos de tejido adiposo:** En este caso no se emplea ninguna enzima. La muestra de tejido original se disgrega mecánicamente con la ayuda de herramientas de cirugía estériles. Las porciones de tejido o explantos se montan en una placa de cultivo con

medio basal. Al cabo de unos días, las células comienzan a migrar desde el seno del tejido hacia la superficie de la placa (Hendijani., 2016).

Ambas metodologías de extracción de MSC de tejido adiposo (AdMSC) presentan ventajas y desventajas. Por un lado, la digestión enzimática produce un cultivo más limpio, con menor probabilidad de contaminaciones. A su vez, las sucesivas centrifugaciones que se realizan ayudan a descartar componentes no deseados, como los sanguíneos. Sin embargo, la desventaja de este método es que los factores de la matriz extracelular que pueden ser beneficiosos para la adaptación de las células a la placa se descartan tras cada centrifugación (Hendijani., 2016). Por otro lado, en el caso del cultivo de explantos, éstos toman más tiempo para recuperar células dado que las mismas deben migrar desde el seno del tejido hacia la placa y, también, el protocolo es más propenso a contaminaciones debido a que el tejido no se digiere, y a que sólo se desinfecta de manera superficial. Sin embargo, utilizando esta técnica, la matriz extracelular del tejido no se pierde, proveyendo a las células con señales bioquímicas y biomecánicas que pueden ser esenciales para la adaptación, el mantenimiento de la homeostasis del cultivo y su diferenciación (Hendijani., 2016).

Una vez que se logra aislar a las AdMSC, existen diversos marcadores moleculares para confirmar de que se trata del tipo celular de interés. Como se mencionó previamente, la expresión de éstos marcadores puede variar dependiendo del tejido y de la especie de donde se las obtenga. A continuación se detallan algunos de los marcadores conocidos de AdMSC para algunas especies como el bovino y pollos (Tabla 1).

Tabla 1: Marcadores conocidos para AdMSC de bovinos y de pollos.

Fuente	Especie	Marcadores positivos	Marcadores negativos	Referencia
Tejido adiposo	Bovinos	<i>CD29, CD166, CD105, CD73, CD44, CD90</i>	CD45, CD34	Oyarzo (2021) Hill (2019)
	Aves domésticas	<i>CD29, CD44, CD73, CD71</i>	CD45, CD31, CD34	Gong (2011) Svoradova (2021)

Es relevante destacar que estos marcadores no necesariamente reflejan un estadio de “no-diferenciación”, sino que son proteínas que se expresan en la superficie de las AdMSC (en el caso de los marcadores positivos) y que, en conjunto con la ausencia de expresión de marcadores negativos y con la diferenciación exitosa de las células, corroboran la identidad de las células madre mesenquimales en el cultivo.

Las AdMSC son capaces de diferenciarse hacia múltiples linajes, principalmente a tejidos mesodérmicos como osteocitos, adipocitos y condrocitos. Esto se logra a partir de la incubación de las AdMSC con factores de crecimiento e inhibidores específicos como dexametasona, indometacina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), insulina-transferrina-selenio (ITS), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros, que resultan en la diferenciación gradual del cultivo (Fig. 4) (Ciuffreda y col., 2016).

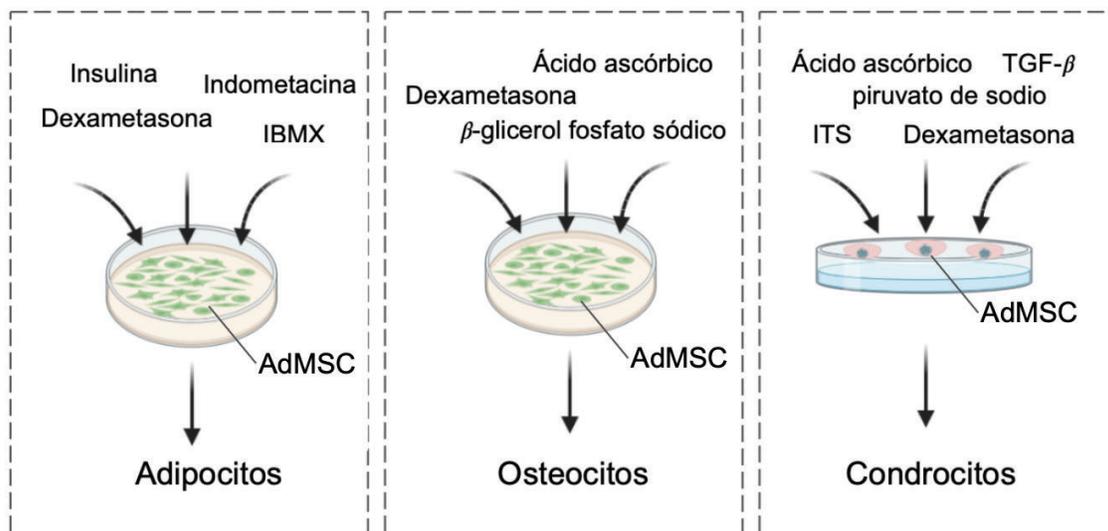


Figura 4: Factores utilizados para inducir la diferenciación in vitro de las AdMSC hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos.

Un aspecto clave a resaltar es que el evento de diferenciación resulta de la combinación de las propiedades que se expresan a nivel de célula única. Es decir, un cultivo no tendrá a todas sus células sincronizadas al mismo tiempo sino que el tiempo en el que transcurren los eventos de diferenciación son distintos para cada célula. Las poblaciones de células madre no son homogéneas sino que las células se comportan individualmente aunque estén derivadas de manera clonal. A esta

característica se la llama “estocasticidad temporal” (M. Pittenger., 2019).

In vivo, la capacidad de diferenciación de las células es un proceso dinámico que varía según la necesidad fisiológica del individuo. Es importante destacar que el estadio de “no-diferenciación” es un estadio ficticio recreado *in vitro* gracias a las condiciones de cultivo empleadas. Es por ello que tanto el perfil molecular como capacidad de diferenciación de las células debe ser corroborado a lo largo del cultivo *in vitro*, ya que es frecuente observar la pérdida de las características “*stem*” de las células debido a diversos factores como los componentes del medio de cultivo, confluencia celular, entre otros (Loh y col., 2011).

1.4 Células madre mesenquimales y su relevancia en medicina regenerativa

Las células madre mesenquimales son ampliamente estudiadas y empleadas para desarrollar terapias celulares aplicadas a la regeneración de tejidos. Esto se debe a su capacidad para diferenciarse en múltiples linajes y de secretar mediadores solubles que regulan la proliferación y diferenciación en el microambiente celular (Saeedi y col.,2019). Además, se ha demostrado que en tratamientos de regeneración *in vivo* estas células pueden migrar, mediante el proceso llamado “*homing*”, como respuesta al daño tisular y promover la regeneración del tejido, estimulando la secreción de factores paracrinos con efectos pleiotrópicos (Salgado y col.,2010 ; Yu y col., 2019). Finalmente, dado que no expresan una cantidad significativa de complejos de histocompatibilidad, no montan una respuesta inmune severa y por lo tanto, no producen rechazo alógeno (Khang y col., 2007), siendo posible el uso de estas células de forma heteróloga en individuos pertenecientes a una misma especie.

1.4.1 Regeneración ósea

Si bien algunas fracturas pueden regenerarse de manera natural, otras afecciones pueden conllevar a una gran pérdida de tejido óseo donde la osteogénesis de manera fisiológica no es suficiente para remediar al tejido. En la clínica tanto humana como animal, se suelen emplear

injertos de hueso autólogo como terapia para el tratamiento de estas afecciones. Sin embargo, esta metodología presenta complicaciones dado a que la fuente de suministro de hueso autólogo es limitada, y que los tiempos de las cirugías son extensos y conllevan a la pérdida de sangre y a la interrupción de la estructura ósea en el sitio de donde se extrae el tejido donante. Por otro lado, los injertos alogénicos suelen presentar problemas de rechazo inmunológico (Yu y col., 2019; Hill y col., 2019).

Por esta razón es que se están estudiando distintos enfoques, entre los cuales se considera emplear un tratamiento con MSC para promover la regeneración ósea. La técnica más utilizada denominada “inyección directa” consiste en aspirar médula ósea desde la cresta ilíaca y luego inyectar un concentrado de MSC en el sitio donde ocurrió la lesión. La efectividad de ésta técnica fue demostrada tanto en animales como en ensayos clínicos en humanos. En 1998, se empleó la técnica de inyección directa en 20 pacientes que tenían fractura de tibia, de los cuales 18 mostraron una recuperación completa luego de 6 a 8 meses (Connolly., 1998). En 2002, se describió que existe una correlación positiva entre la cantidad de concentrado inyectado de MSC proveniente de médula ósea y la formación de hueso mineralizado en 60 pacientes con fracturas óseas (Hernigou y col., 2002). Sin embargo, esta técnica no se emplea como terapia de rutina debido a que los preparados celulares pueden estar impuros y a que se requiere una alta cantidad de MSC para lograr una reparación exitosa del tejido, siendo necesario extraer grandes cantidades de médula ósea (Le y col., 2021).

En base a estos antecedentes es que se empezaron a implementar MSC obtenidas a partir de otras fuentes, como las AdMSC. Estas células pueden ser obtenidas de manera simple con un gran grado de pureza y las cirugías para extraerlas son menos invasivas, por lo que se considera que las AdMSC tienen un excelente potencial para ser usadas como fuente primaria para ingeniería de tejidos óseos (Yu y col., 2019; Hill y col., 2019). Además, las AdMSC tienen una alta capacidad de proliferación, poseen un enriquecimiento en este tejido de 500 veces más en comparación a las MSC de médula ósea, son resistentes a senescencia y son capaces de retener su potencial de diferenciación por períodos más largos (Le y col., 2021).

En 2015, se trataron a 6 pacientes con fractura ósea con trasplantes autólogos de AdMSC provenientes de grasa subcutánea. Luego de la extracción, se purificaron, amplificaron *in vitro* y se incubaron en medio de inducción a osteogénesis. Posteriormente, se inyectaron al sitio donde se

encontraba la lesión junto con matriz ósea desmineralizada; y luego de un año, se observó que 3 de los 6 pacientes lograron regeneración total del hueso, y ninguno de los 6 pacientes presentaron efectos adversos (Dufrane y col., 2015). Si bien este estudio fue pionero en demostrar la efectividad y seguridad del uso de AdMSC para regeneración ósea, existen muchos otros estudios clínicos en los que también se demostró la seguridad de las mismas para ese tipo de tratamientos, aunque todavía se requiere más evidencia para confirmar que las AdMSC inducen de manera significativa a la regeneración ósea en humanos (Le y col., 2021).

En animales, la mayor parte de los reportes disponibles en los que se utilizaron AdMSC para la regeneración ósea fueron realizados en mamíferos de interés agropecuario. Existen trabajos en cerdos, vacas, cabras y ovejas en los que se ha demostrado que el tratamiento con AdMSC en individuos que presentaban lesiones óseas significativamente mejoraba la regeneración del hueso en comparación con el grupo control (Ando y col., 2007; Harness y col., 2022), demostrando la efectividad del tratamiento. Sin embargo, en otras especies de animales no mamíferos como las aves, estos tratamientos no han sido implementados.

1.4.2 Regeneración de cartílago

La reparación del cartílago en muchas especies es complicada debido a la poca irrigación natural que poseen los cartílagos y a la lenta proliferación de los condrocitos. Actualmente, se emplea trasplante de médula ósea o trasplante osteocondral para estimular la reparación, pero se da de manera incompleta o parcial y los injertos son difíciles de integrar, llevando a que sólo se retrase el deterioro del cartílago (Le y col., 2020). También se suelen emplear otras estrategias como terapias hormonales o con citoquinas, aunque tienen ciertas desventajas dado que estas moléculas difunden del sitio diana, pudiendo conllevar a efectos adversos (Le y col., 2020).

Las limitaciones previamente mencionadas incentivaron la búsqueda de nuevas estrategias para promover la regeneración del cartílago. Para estos casos, las MSC pueden ser una alternativa, no sólo por su capacidad de diferenciación a condrocitos sino por su secretoma conformado por colágeno, fibronectina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos que junto con un conjunto de citoquinas, puede conllevar a la reconstrucción integral del cartílago (Yu y col., 2019; Le y col.,

2020). El grupo de Hanxiang Le del departamento de ortopedia de la universidad de Jilin en China, verificó que los estudios clínicos realizados con MSC demuestran que las mismas retrasan la progresión de la degeneración del cartílago, aliviando el dolor y mejorando la función articular en pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide. Este mismo estudio sugiere que emplear factores condrogénicos podría regular la diferenciación, proliferación y actividad metabólica de las MSC, lo que no sólo retrasaría la degeneración, sino que también induciría la regeneración del tejido en humanos (Le y col., 2020).

En animales como el cerdo, vaca, oveja y cabra, se testeó la regeneración de hueso y cartílago inducidos por MSC de diversos tejidos. Tras la inyección de las células de manera intravenosa, se logró observar que las mismas no sólo eran capaces de migrar de manera direccional hacia el tejido dañado, sino que podían inducir la regeneración del mismo (Harness y col., 2022).

Pese a los avances de esta técnica, existen diversas especies en las que ésta metodología aún no ha sido investigada. En aves, la acción terapéutica de MSC aún no fue explorada pero plantea ser una herramienta muy prometedora en terapias celulares inmunomoduladoras (Svoradova y col., 2022).

1.4.3 Tratamiento de otras afecciones

Actualmente, se están desarrollando terapias que utilizan MSC como principio activo para tratar numerosas patologías. Algunas de estas terapias son para inducir la regeneración de córnea, de miocardio, de hígado, para reconstruir parte del sistema nervioso central y periférico, para la regeneración de la tráquea, y para tratar lesiones en la piel.

La piel es la primera barrera de defensa ante daños físicos o ante patógenos que posee el organismo, por lo que siempre se busca su preservación y cuidado. Cuando la herida es muy extensa, las opciones que existen consisten en emplear trasplantes autólogos o alogénicos de piel. La cicatrización de este tipo de heridas involucra un proceso complejo, implicando interacciones entre mediadores solubles, la matriz extracelular y las células sanguíneas. Ambos métodos de terapia se ven limitados por la disponibilidad de tejido, y también existe la posibilidad de contagio de enfermedades, o de que ocurra el rechazo inmunológico del trasplante en caso de ser alogénico. Hoy

en día, se están desarrollando terapias que combinan MSC con *scaffolds* biocompatibles que promueven la regeneración de la herida devolviéndole el grosor necesario a la piel (Laverdet y col., 2014).

Los antecedentes aquí presentados denotan el amplio potencial que poseen las MSC en medicina regenerativa en diversas especies. Sin embargo, existen otras aplicaciones en las que el uso de MSC resulta atractivo, como por ejemplo en el desarrollo de terapias genéticas e inmunomoduladoras, en el campo de la biotecnología de la reproducción, y en la conservación de especies silvestres.

1.4.4 Nuevo enfoque: MSC y su potencial para la conservación de especies

La conservación de la vida silvestre es fundamental para mantener el equilibrio de los ecosistemas y para la preservación de la biodiversidad. La biodiversidad ha disminuido drásticamente debido a diversas actividades realizadas por los seres humanos que resultan en una variedad de crecientes amenazas. Éstas atentan contra la conservación de las especies al provocar la alteración, la fragmentación y la degradación de sus hábitats.

Las actividades humanas que tienen un mayor impacto sobre los ecosistemas, según el Ecoparque Interactivo de Ciudad Autónoma de Buenos Aires, son:

1. El avance de la frontera agropecuaria.
2. Actividades extractivas para la obtención de recursos naturales como minerales y combustibles fósiles.
3. Explotación directa e indirecta de seres vivos: sobrepesca, actividad forestal, caza y tráfico ilegal.
4. Urbanización y desarrollo industrial y su consecuente contaminación de recursos.
5. La introducción de especies exóticas invasoras.

Los métodos tradicionales de conservación como la cría en cautiverio o la protección del hábitat, juegan un rol muy importante. Sin embargo, muchas especies tienen dificultades para

reproducirse en cautiverio y la protección de hábitats por sí sola puede no ser suficiente frente a condiciones ambientales que cambian continua y rápidamente. Por lo tanto, es imperativo explorar e implementar enfoques nuevos e innovadores para la conservación, diversificando estas estrategias, lo que puede aumentar la probabilidad de preservar con éxito a las especies que habitan la Tierra.

Desde el Ecoparque Interactivo de Ciudad Autónoma de Buenos Aires, se trabaja diariamente en la ejecución de acciones en favor de la conservación de la vida silvestre, llevando adelante diversos programas de conservación. Dentro de ellos, se encuentra el programa “Conservación del Águila coronada”, el cual tiene como objetivo desarrollar tecnología para promover la conservación de esta especie, así como también la de otras aves rapaces/silvestres que lo necesiten.

El águila coronada o águila del Chaco (*Buteogallus coronatus*) es una especie endémica de América del Sur. Su distribución natural es el centro y sur de América del Sur: Brasil, Bolivia, Paraguay y Argentina (Fig. 5). Se estima que la población en su área de distribución natural es menor a los 1000 individuos, y que presenta una tendencia decreciente según el Centro para el Estudio y Conservación de las Aves Rapaces (CECARA) de la Universidad Nacional de La Pampa.



Figura 5: A la izquierda se encuentra un ejemplar de águila coronada (*Buteogallus coronatus*) y a la derecha, en naranja, se muestra su distribución natural en el centro y sur de América del sur. Imágenes recuperadas del sitio oficial del Ecoparque Interactivo de Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

El Ecoparque de Ciudad Autónoma de Buenos Aires, es un centro de rescate para aves silvestres que tiene como objetivo tratar a aquellos ejemplares lastimados para su posterior liberación. Las lesiones más frecuentes con las que llegan los ejemplares, observadas por el centro de rescate, son en las extremidades anteriores, causadas por heridas de armas de fuego o por encuentros con molinos eólicos en caminos migratorios. Si bien se practican tratamientos convencionales para recuperar a éstos individuos (cirugía traumatológica, inmovilización y terapias con ozono, entre otros), rara vez un individuo con una lesión grave puede recuperarse de manera rápida, quedando en cautiverio por largos períodos de tiempo y dificultando su posterior liberación.

Debido a las ventajas antes descritas, las MSC podrían ser empleadas como principio activo para inducir la regeneración tisular en aves heridas y, de esta forma, contribuir a la conservación de éstas especies (Svoradova y col., 2023). Sin embargo, aún no existen terapias celulares puestas en práctica en aves, y únicamente existe un reporte en aves domésticas en los que hayan logrado aislar AdMSC (Gong y col., 2011). En base a esto y a lo mencionado anteriormente, en este trabajo se buscó conformar un biobanco de AdMSC de distintas especies de aves silvestres para que en un futuro puedan ser utilizadas como método regenerativo para tratar lesiones en aves silvestres en recuperación. Lograr la puesta a punto de la extracción de AdMSC a partir de especies de aves, su amplificación *in vitro* y criopreservación, supondría un avance en los procedimientos empleados para la biología aplicada a la conservación de especies.

A continuación se muestra una ilustración que resume lo descrito en la introducción de este trabajo (Fig.6):

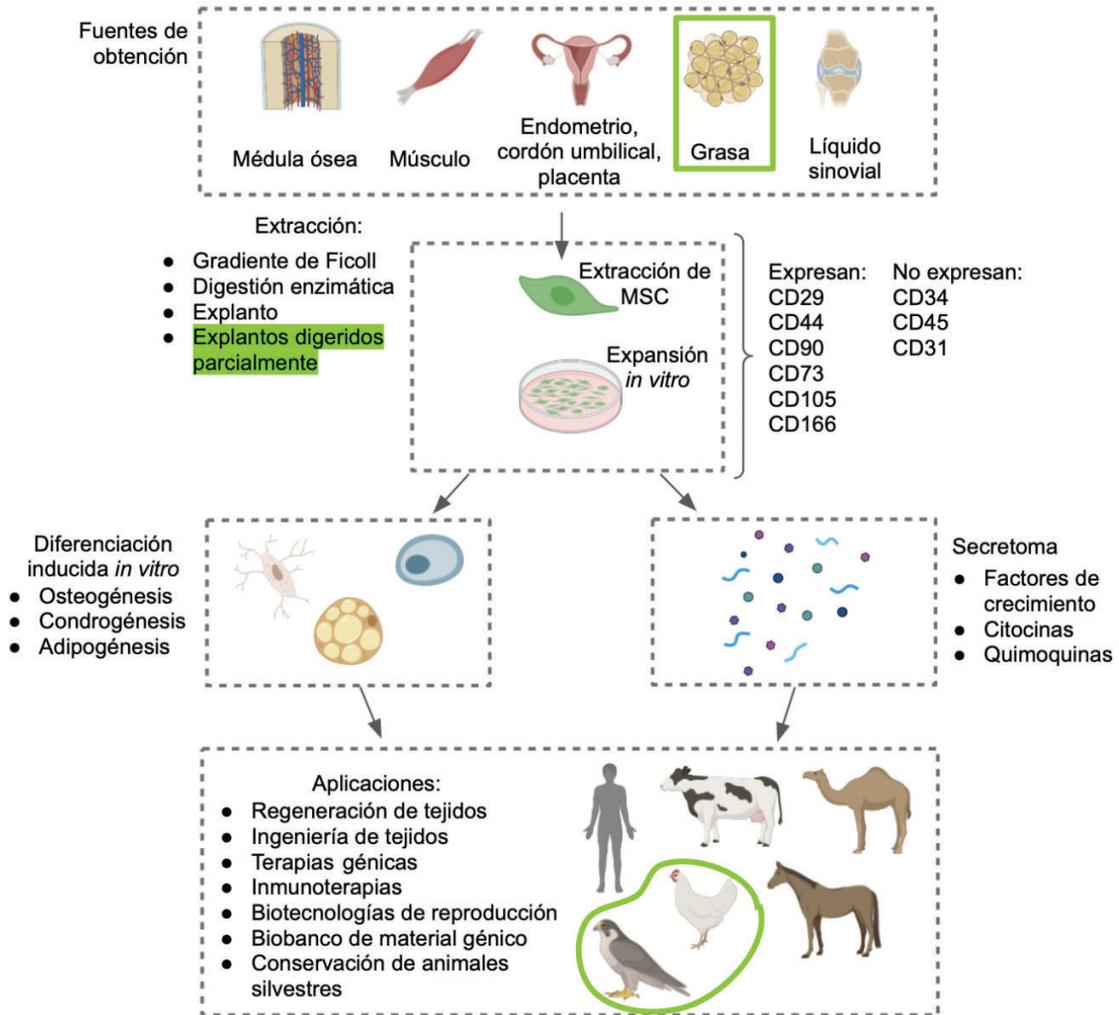


Figura 6: Fuentes de obtención, métodos de extracción, características y aspectos generales de las células madre mesenquimales. El método de extracción de MSC de tejido adiposo utilizando explantos digeridos enzimáticamente de manera parcial (resaltado en verde) fueron propuestos y puestos en práctica por primera vez en este trabajo de tesis.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El águila coronada es un ave rapaz, endémica del norte de Argentina, que se encuentra en vías de extinción. Es frecuente observar ejemplares de distintas especies de aves silvestres que llegan con lastimaduras en sus extremidades anteriores a las instalaciones del Ecoparque de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, lo cual supone un desafío para lograr reinsertarlas en su hábitat natural y preservar la especie. En base a esto y a la bibliografía consultada para otras especies, se propone el uso de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo como terapia celular para inducir la reparación de los tejidos dañados que no logran regenerarse de manera natural o utilizando terapias convencionales. Sin embargo, debido a que existen escasos reportes que hayan logrado aislar exitosamente AdMSC de especies aviares, es evidente la necesidad de estandarizar el aislamiento, cultivo *in vitro*, caracterización y criopreservación de éstas células para estas especies.

De esta forma, se planteó como hipótesis del presente trabajo, que mediante el procesamiento de tejido adiposo de pollos y aves silvestres se podrán obtener y cultivar *in vitro* células madre mesenquimales que conserven su capacidad multipotente de forma estable, para que en un futuro, puedan ser utilizadas como principio activo en terapias regenerativas.

2.2 Objetivo general

Derivar, expandir y caracterizar células madre mesenquimales a partir del procesamiento de tejido adiposo de pollos y aves silvestres.

2.3 Objetivos específicos

- (1) Establecer y eficientizar los protocolos de extracción, cultivo celular, caracterización y diferenciación de MSC provenientes de tejido adiposo de aves domésticas como el pollo.
- (2) Utilizar los procedimientos previamente aplicados en pollos para obtener y caracterizar AdMSC de aves silvestres.
- (3) Establecer un biobanco de AdMSC de aves silvestres a partir del material obtenido de los distintos ejemplares de especies silvestres con los que se trabaje.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento y cultivo *in vitro* de AdMSC

Las muestras de grasa de aves, tanto de pollos como de aves silvestres, fueron facilitadas por el Ecoparque de Ciudad Autónoma de Buenos Aires con el permiso de dicha institución en el marco del programa de conservación del águila coronada. En el caso de pollos y aves silvestres (excepto *P. uncinatus* y *B. coronatus*), las muestras fueron obtenidas a partir de ejemplares eutanasiados. Para el caso de la muestra de *P. uncinatus* y *B. coronatus*, las muestras de grasa fueron recolectadas durante una cirugía realizada por profesionales veterinarios de la zona intraperitoneal de los ejemplares. Para la especie bovina, las muestras de grasa fueron recolectadas en un frigorífico de la localidad de San Martín y transportadas a temperatura ambiente en solución fisiológica suplementada con antibióticos. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron lavadas numerosas veces con solución fisiológica y antibióticos para eliminar posibles contaminantes.

Para extraer AdMSC bovinas y de aves, se utilizó un protocolo de digestión enzimática puesto a punto previamente en nuestro laboratorio y descrito previamente en la bibliografía (Gong y col., 2011; Silva y col., 2014; Sampaio., 2015; Ciufredda y col., 2016) que consistía en disgregar la grasa mecánicamente y luego enzimáticamente utilizando una solución de 1 mg/mL de colagenasa tipo I 30'-1 h a 37 °C. Para detener la reacción enzimática, se utilizó el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12* (DMEM F12) suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB). Se centrifugó durante 12 minutos a 300 g y el *pellet* celular fue resuspendido para separar a las AdMSC del posible tejido conectivo remanente. A continuación, se tomó el sobrenadante y se realizó una nueva centrifugación para precipitar las AdMSC. Las AdMSC obtenidas fueron cultivadas en el medio DMEM F12 suplementado con 10 % SFB, 100 U/mL penicilina/estreptomicina, 2 mM glutamina y 2 mM aminoácidos no esenciales (MEM NEAA) (**medio basal**) a 38,5 °C, 5 % CO₂ (Fig. 7). Cabe mencionar que durante las primeras 48 h, se incluyó 50 µg/mL gentamicina y 250 ng/mL anfotericina en el medio para evitar posibles contaminaciones.

Además del método de extracción de AdMSC por digestión enzimática, en el caso de las AdMSC de aves, se probaron dos protocolos de extracción adicionales (Fig. 7). Por un lado, se probó la técnica de explantos en donde la grasa fue digerida mecánicamente en fragmentos de 1 mm de diámetro y los mismos fueron cultivados en medio basal a 38,5 °C, 5 % CO₂. Por otro lado, se probó una combinación de los protocolos anteriores en donde la grasa fue digerida en fragmentos

de 1 mm de diámetro y tratada con colagenasa tipo I durante 20 minutos, y luego, los explantos parcialmente digeridos fueron cultivados en medio basal a 37,5 °C, 5 % CO₂.

En todos los casos, el medio de cultivo fue renovado cada 48-72 h y al alcanzar un 80 % de confluencia, las células fueron tratadas con TryPLE™ Express y sub-cultivadas en un ratio de relación 1:3 o 1:5 dependiendo de la línea celular. Para el cultivo de AdMSC provenientes de águila coronada, el medio de cultivo inicial fue suplementado con 10 ng/μL del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

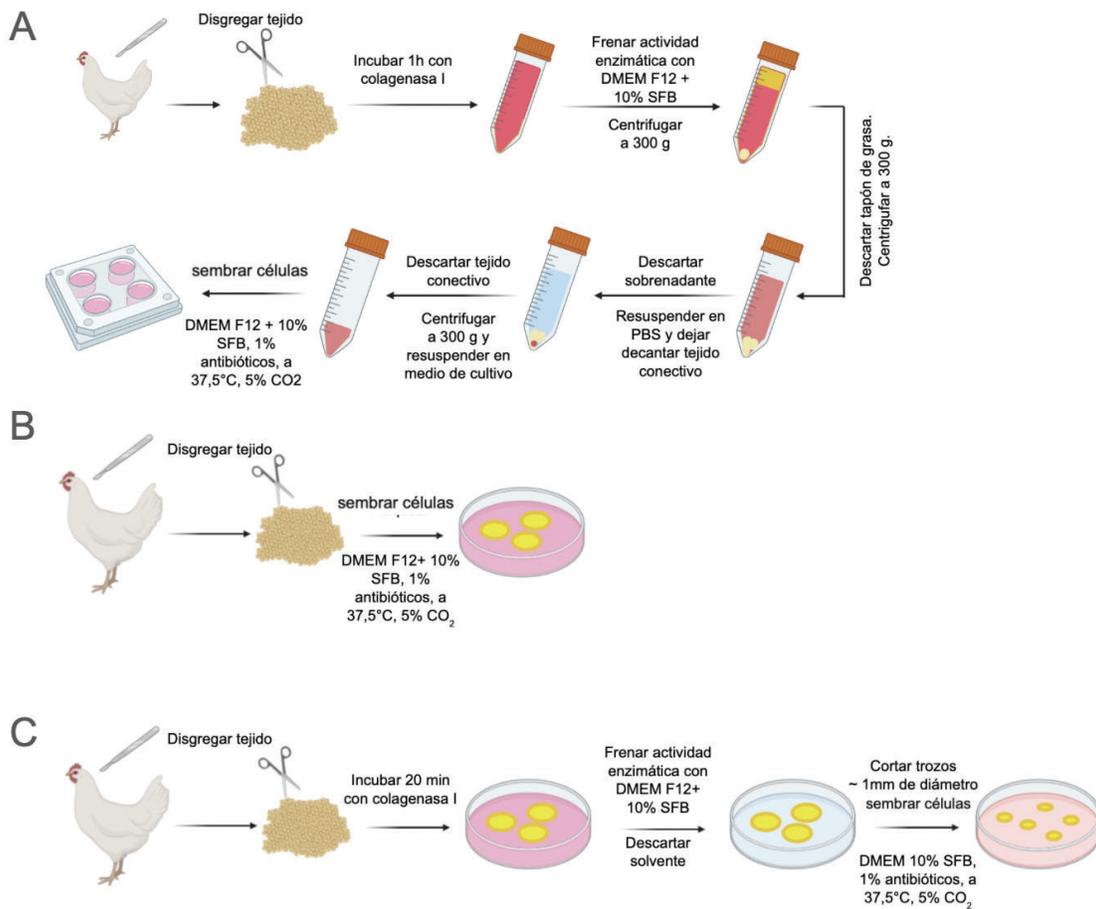


Figura 7: Metodologías empleadas para la extracción de MSC provenientes de tejido adiposo. (A) Digestión enzimática del tejido adiposo, (B) Cultivo de explantos de tejido adiposo y (C) Cultivo de explantos de tejido adiposo digeridos de manera parcial.

3.2 Criopreservación de AdMSC

Las AdMSC de las especies evaluadas fueron criopreservadas en criotubos empleando DMEM F12 suplementado con 20 % SFB y 10 % dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras fueron almacenadas por 24 h a -80 °C y luego transferidas a un termo de N₂ líquido por tiempo indefinido. Para descongelar las muestras, los criotubos fueron descongelados en un baño térmico a 37 °C y el contenido fue diluído en relación 1:3 en DMEM F12 con 10 % SFB. Tras su centrifugación a 300 g, se resuspendió el *pellet* en medio basal y las células fueron sembradas en placas para continuar con el cultivo celular. En el caso de *B. coronatus*, se evaluó la viabilidad celular luego de la criopreservación por medio de tinción con azul de tripan.

3.3 Evaluación de distintos medios de cultivo basales y determinación del tiempo de duplicación celular

Con el fin de determinar el medio basal que más favorecía a la proliferación celular, se probaron los medios basales DMEM F12 y DMEM con alta o baja glucosa suplementados con 10 % de SFB, y se determinó el tiempo de duplicación de la población celular (PDT, del inglés “*population doubling time*”). Para ello, se confeccionó una curva de crecimiento utilizando tres muestras independientes de AdMSCs en pasaje 5 de *Gallus gallus domesticus* (n=3), incluyéndose triplicados técnicos para cada muestra, para cada uno de los medios evaluados. Las mediciones fueron realizadas cada día, durante 8 días. El PDT fue calculado mediante la ecuación:

$$PDT = T \times \frac{\ln 2}{\ln\left(\frac{X_e}{X_b}\right)}$$

donde “Xe” y “Xb” corresponden al valor promedio del conteo de células totales en dos días de la fase exponencial de la curva (siendo “Xe” el valor final y “Xb” el valor inicial), y “T” corresponde al tiempo transcurrido en horas, entre esos dos días. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples de *Tukey*, estableciendo diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (p <0,05).

3.4 Extracción del ARN total, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a punto final.

El ARN total fue extraído utilizando el método de Trizol-isopropanol. Para ello, las células fueron resuspendidas en 750 μL de Trizol y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se continuó con la extracción. Las muestras fueron posteriormente descongeladas en hielo y homogeneizadas. Se colocaron 200 μL de cloroformo y se dejó reposar a las muestras por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se tomó la fase superior acuosa e incolora donde se encontraba el ARN. A esa solución se le agregó 500 μL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, y se centrifugó nuevamente a 12000 g por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 mL de etanol 75 %, continuado de una centrifugación a 7600 g por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 10 μL de agua libre de ARNasas.

Una vez obtenido el ARN, se procedió con la retrotranscripción (RT) del mismo empleando la enzima comercial SuperScriptTM III (ThermoFisher) con oligonucleótidos al azar. Para la RT se preparó una solución conteniendo 100 ng de oligonucleótidos al azar, 1 μL de 10 mM de dNTPs junto con 100-200 ng de muestra de ARN. Se calentó la solución por 5 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó brevemente. Se agregaron 4 μL de *First Strand Buffer*, 1 μL de 0.1 M de DTT junto con 1 μL de la enzima *SuperScript*TM III (200 unidades/ μL). Se homogeneizó la solución final, y se incubó por 5 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se procedió a la RT por 60 minutos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se inactivó la reacción incubando la solución por 15 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, el ADN copia (ADNc) obtenido fue amplificado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final utilizando la polimerasa Taq (Taq Pegasus, PB-L) con oligonucleótidos específicos que fueron diseñados para los genes de interés (Tabla 2). Para la PCR, se hizo una mezcla de reacción que consistió en 500 ng de ADNc, 2 mM de MgCl_2 , 1 X de la solución *buffer* incluida en el kit, 0,2 mM de dNTPs y agua hasta un volumen final de 20 μL . La mezcla de reacción fue amplificada con la siguiente configuración: desnaturalización a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, seguido de 32 ciclos de: 15 segundos a $92\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 segundos a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*annealing*) y 15 segundos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (extensión). Los amplicones resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % m/v teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para marcadores de AdMSC bovinas y de aves.
N/A: no aplica.

Gen		AdMSC bovinas	AdMSC de aves	Tipo de marcador
CD29	Sentido:	GAAACTTGGTGGCATCGT	GCCAAGTGGGATACGGGTGA	Específico de AdMSC
	Antisentido:	CTCAGTGAAGCCCAGAGG	ACGCTGCATACAGTGTCTGT	
	Longitud del amplicón:	493 pb	119 pb	
CD44	Sentido:	CGGAACATAGGGTTTGAGA	GCCCATGTACCAGAATGGCT	Específico de AdMSC
	Antisentido:	GGTTGATGTCTTCTGGGTTA	GTCTTCCTGTCTCCACTGC	
	Longitud del amplicón:	301 pb	155 pb	
CD90	Sentido:	N/A	ATCCAAAGCACCATCAGCGT	Específico de AdMSC
	Antisentido:	N/A	CGCACTTCTCCAGTTTGTCTTTGA	
	Longitud del amplicón:	N/A	205 pb	
CD73	Sentido:	CAATGGCACGATTACCTG	N/A	Específico de AdMSC
	Antisentido:	GACCTTCAACTGCTGGATA	N/A	
	Longitud del amplicón:	428 pb	N/A	
CD166	Sentido:	TATCAGGATGCTGAAAC	N/A	Específico de AdMSC
	Antisentido:	TAGCCAATAGACGACACC	N/A	
	Longitud del amplicón:	498 pb	N/A	
CD45	Sentido:	CTACCCAACCTTCTACTCAA	N/A	Específico para células del linaje hematopoyético
	Antisentido:	TTCACATCCAGGAGGTTC	N/A	
	Longitud del amplicón:	314 pb	N/A	

CD34	Sentido:	CCTCATCAGCTTTGCGACTT	GTGCCACAACATCAAAGACG	Específico para linaje hematopoyético
	Antisentido:	CCAGGAGCAAGGAGCACA	GGAGCACATCCGTAGCAGGA	
	Longitud de amplicón:	314 pb	239 pb	
YWHAZ	Sentido:	GCATCCCACAGACTATTTCC	N/A	Gen de referencia
	Antisentido:	GCAAAGACAATGACAGACCA	N/A	
	Longitud de amplicón:	120 pb	N/A	
GAPDH	Sentido:	N/A	GCTAAGGCTGTGGGGAAAGT	Gen de referencia
	Antisentido:	N/A	TCAGCAGCAGCCTTCACTAC	
	Longitud de amplicón:	N/A	161 pb	

3.5 Inducción de la diferenciación celular a osteocitos, condrocitos y adipocitos

Para evaluar la capacidad multipotente de las AdMSC, se indujo la diferenciación de las células a los tres linajes mesodérmicos principales: osteocitos, condrocitos y adipocitos.

Para inducir la osteogénesis, se sembraron 10.000 células/cm² en medio de diferenciación osteogénica el cual estaba compuesto por el medio basal suplementado con 100 nM dexametasona, 10 mM β -glicerol fosfato sódico y 0,05 mM ácido ascórbico, durante 21 días a 38,5 °C, 5 % CO₂. Transcurrido ese período, se retiró el medio, se lavó con DPBS y se realizó la fijación usando 4 % m/v paraformaldehído por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de la fijación, se lavó tres veces el preparado con agua bidestilada y se tiñó con Alizarin Red a pH 4,2 por 2-3 minutos para evidenciar los depósitos de calcio, fenotipo característico de este linaje celular. Una vez terminada la tinción, se lavó con agua bidestilada y se observó el preparado con un microscopio (Fig. 8A).

Para inducir la diferenciación a condrocitos, se empleó la técnica de gota en suspensión (del inglés *hanging drop*). Se sembraron gotas de 10 μ L con una concentración de 100.000 células/ μ L y se incubaron a 38,5 °C, 5 % CO₂ en el medio de diferenciación condrogénico que incluía: medio basal, 100 nM dexametasona, 1 μ g/mL ácido ascórbico, 1 mg/mL piruvato de sodio, 10 ng/mL TGF- β , y 10 % insulina-transferrina-selenio. Luego de 14 días, las células fueron teñidas con el

colorante Alcian Blue que tiñe específicamente glicosaminoglicanos (Fig. 8B). Con este fin, se retiró el medio, se lavó con DPBS y se realizó la fijación usando 4 % m/v paraformaldehído por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó tres veces el preparado con agua bidestilada y se tiñó con Alcian Blue (preparado en 0,1 N NaCl) por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminada la tinción, se lavó con 0,1 N NaCl, luego con agua bidestilada y el preparado fue observado con un microscopio.

Por último, para inducir la diferenciación hacia el linaje adipogénico, se sembraron 16.000 células/cm² y se probaron dos protocolos distintos. El primer protocolo consistió en crecer a las células durante 14 días a 38,5 °C, 5 % CO₂ en el medio basal suplementado con el *cocktail* adipogénico que consistía en 1 μM dexametasona, 0,5 mM IBMX, 200 μM indometacina y 10 μg/mL insulina. El segundo protocolo se basó en una diferenciación secuencial donde las células fueron incubadas por 24 h en presencia del medio basal suplementado con el *cocktail* adipogénico y luego, fueron cultivadas por 4 días en presencia del medio basal suplementado con 10 μg/mL de insulina. En ambos casos, las células fueron teñidas con el colorante Oil Red O para evidenciar los depósitos lipídicos en el interior celular (Fig. 8C). Para ello, se retiró el medio, se lavó con DPBS y se realizó la fijación usando 4 % m/v paraformaldehído por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de la fijación, el preparado fue lavado con agua bidestilada y teñido con Oil Red O por 30 minutos. Una vez terminada la tinción, se lavó con agua bidestilada y el preparado fue observado con un microscopio.

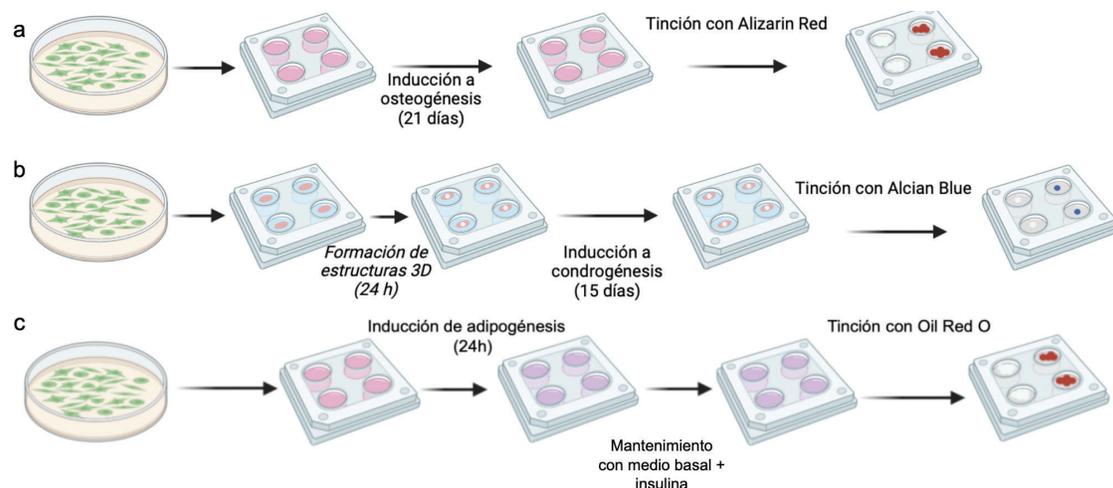


Figura 8: Esquema de la metodología empleada para inducir la diferenciación de las AdMSC hacia (A) osteocitos, (B) condrocitos y (C) adipocitos.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de AdMSC de pollos

Debido a que no existen reportes en los que se hayan aislado AdMSC de aves silvestres y que únicamente se encuentra disponible un trabajo en aves domésticas (Gong y col., 2011), el primer objetivo de este trabajo consistió en estandarizar los protocolos para aislar y caracterizar AdMSC de pollo. Comenzamos trabajando con muestras de pollo ya que era la especie a la que teníamos acceso que más se asemejaba a las aves silvestres, ya que las muestras de estas últimas eran escasas. Además, los resultados obtenidos fueron comparados con AdMSC bovinas, al ser ésta una especie donde los protocolos de extracción y cultivo se encuentran establecidos.

Se comenzó procesando el tejido adiposo proveniente de pollos a partir de ejemplares para consumo interno de ejemplares del ecoparque. Para el aislamiento de AdMSC, se probó el método de digestión enzimática con colagenasa I. Se probaron distintas cantidades de tejido adiposo inicial (Tabla 3).

Se observó que cuando se procesaban 5 g o más de tejido adiposo, se podían obtener células que presentaban una morfología elongada tipo fibroblastoide, semejantes a las células obtenidas luego de procesar tejido adiposo bovino (Fig. 9). Sin embargo, para cantidades menores (≤ 3 g), las células que se lograron obtener no eran suficientes para conformar un cultivo estable, incluso para la especie de referencia *Bos taurus* (Tabla 3). Debido a esto, se decidió reducir el tiempo de incubación del tejido con la colagenasa cuando se iniciaba el protocolo con pequeñas cantidades de grasa. No obstante, independientemente del tiempo de incubación con la enzima, no fue posible aislar AdMSC al digerir cantidades iguales o menores a 3 g de grasa (Tabla 3).

Dado a que es de suma relevancia poder partir de la mínima cantidad de grasa posible para evitar realizar una cirugía invasiva en el ave que se busca recuperar, se probaron otros protocolos de extracción de AdMSC cuando se partía de pequeñas cantidades de grasa. Se comenzó probando la técnica de explantos en la cual pequeños fragmentos de tejido adiposo eran cultivados para obtener AdMSC. Sin embargo, y al igual que para la técnica de digestión enzimática, no se pudo obtener un cultivo estable partiendo de cantidades iguales o menores a 3 g de tejido. Frente a estos resultados, se planteó como alternativa probar una combinación de ambos protocolos, en donde se incubó al tejido adiposo con colagenasa tipo I por un corto período de tiempo (20 min) y luego, el tejido fue

cultivado hasta observar el crecimiento celular (técnica denominada explantos parcialmente digeridos). Como se puede observar en la Tabla 3, a partir de la digestión parcial y cultivo de los explantos de grasa se pudieron obtener células viables partiendo de hasta 0,02 g, indicando que esta forma de aislamiento de AdMSC constituye un método sumamente conveniente cuando se dispone de una pequeña cantidad de tejido adiposo (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados obtenidos luego de evaluar distintos métodos de extracción de AdMSC. N/A: no aplica.

Especie	Edad	Metodo de extracción	Peso muestra inicial	Enzima	t de digestión	Cultivo exitoso?
<i>Bos Taurus</i>	N/A	Digestion enzimática	10g	Colagenasa I	1h	SI
<i>Bos Taurus</i>	N/A	Digestion enzimática	5g	Colagenasa I	1h	SI
<i>Bos Taurus</i>	N/A	Digestion enzimática	3g	Colagenasa I	1h	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	4 semanas	Digestion enzimática	5,27g	Colagenasa I	1h	SI
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Digestion enzimática	4,37g	Colagenasa I	1h	SI
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Digestion enzimática	3g	Colagenasa I	1h	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Digestion enzimática	3g	Colagenasa I	30 min	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Digestion enzimática	1g	Colagenasa I	30 min	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Digestion enzimática	1g	Colagenasa I	30 min	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Digestion enzimática	0,56g	Colagenasa I	30 min	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto	3g	-	-	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto	3g	-	-	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto	3g	-	-	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto	0,4g	-	-	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto	0,32g	-	-	NO
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto+digestión	1g	Colagenasa I	20 min	SI
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto+digestión	0,7g	Colagenasa I	20 min	SI
<i>Gallus gallus domesticus</i>	14 días	Explanto+digestión	0,02g	Colagenasa I	20 min	SI

Al igual que para el método de digestión enzimática, las células obtenidas luego del cultivo de explantos parcialmente digeridos exhibieron una morfología de crecimiento tipo fibroblastoide, crecían en adherencia, y lograron ser mantenidas en cultivo por más de 10 pasajes, sin observarse cambios en su morfología.

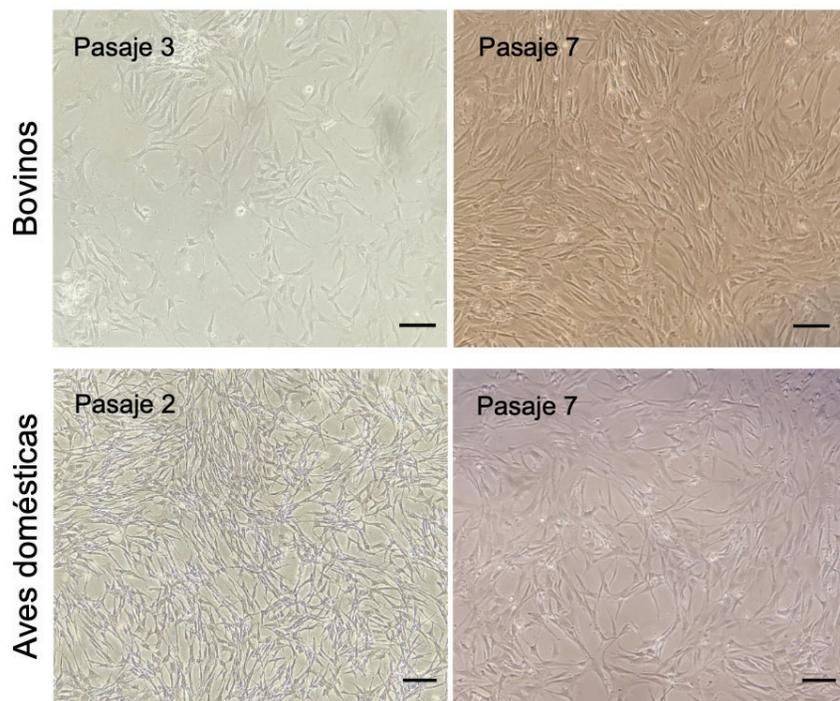


Figura 9: Morfología de crecimiento de las células aisladas de tejido adiposo de pollos y de la especie de referencia (bovino). Imágenes en campo campo de las células obtenidas luego de procesar tejido adiposo bovino y de aves en distintos pasajes. Escala correspondiente a 100 μ m.

4.2 Evaluación de medios basales para optimizar el crecimiento de AdMSC de pollos

Para evaluar el medio de cultivo basal en el cual las células de pollo presentaban una mayor tasa de proliferación, se probaron diferentes medios y se determinó el PDT. Según el PDT, la tasa de proliferación celular de las AdMSC aumentó significativamente cuando las mismas eran crecidas en presencia del medio basal DMEM F12 en comparación con el medio DMEM con alta o baja glucosa, arrojando un PDT de 27 h, 32 h y 37 h, respectivamente ($p < 0,05$). Estos resultados demostraron que las AdMSC de pollos poseen una mayor tasa proliferativa cuando se utilizan medios ricos y complejos como es el medio DMEM F12 (Figura 10).

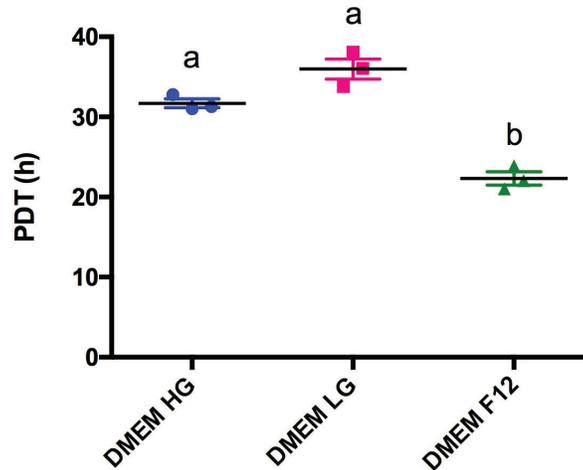
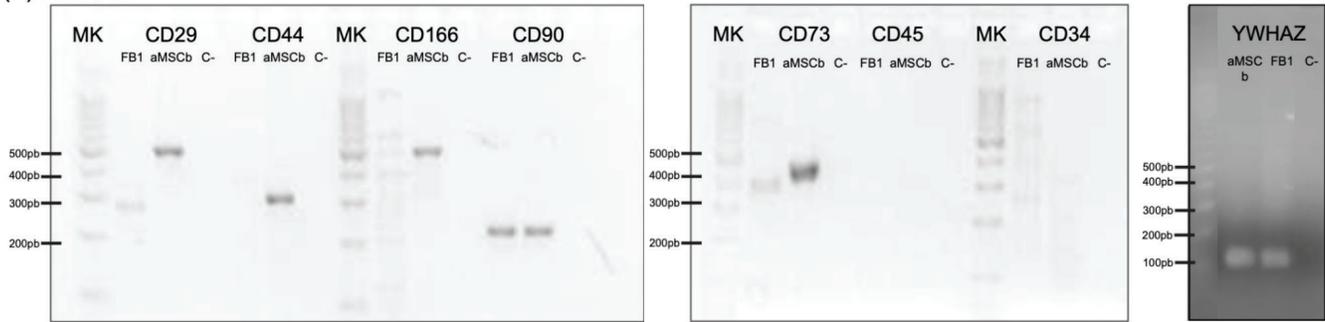


Figura 10: Evaluación de distintos medios basales de cultivo para el cultivo *in vitro* de AdMSC de pollo. Se evaluaron los medios basales DMEM alto en glucosa (DMEM HG), DMEM bajo en glucosa (DMEM LG) y DMEM F12, y se calculó el PDT en horas (h). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

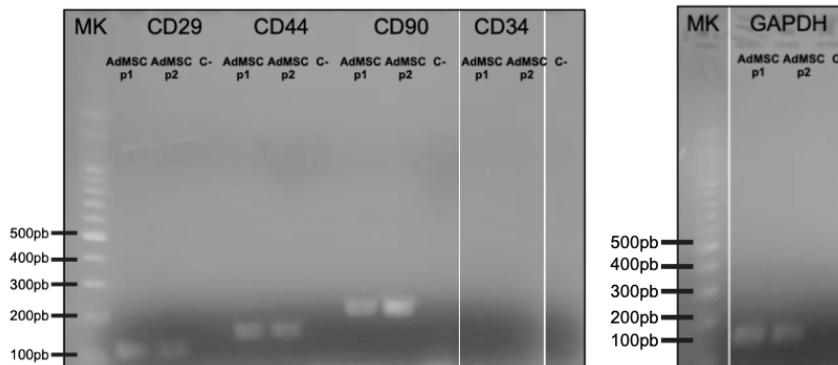
4.3 Evaluación de marcadores moleculares específicos de AdMSC de pollo

Como se comentó anteriormente, en el tejido adiposo se encuentran diversos tipos celulares con perfiles de expresión diferentes. Por lo tanto, para corroborar que las células obtenidas se trataban de células mesenquimales, se comenzó por evaluar la presencia de marcadores moleculares como *cd29* (119 pb), *cd44* (155 pb), *cd90* (205 pb) y *cd34* (239 pb). Al igual que para la especie de referencia (AdMSCb), las dos líneas celulares de pollo analizadas (AdMSCp1-2) mostraron expresión de los marcadores *cd29*, *cd44* y *cd90*, mientras que no se observó expresión del marcador hematopoyético *cd34*, evidenciando la presencia de células madre mesenquimales en el cultivo (Fig. 11A-B). Adicionalmente, se pudo observar que las células mantenían la expresión de estos marcadores luego de numerosos pasajes en cultivo *in vitro* (pasaje 7), indicando que las condiciones de cultivo no alteraban el fenotipo celular (Fig. 11C). De esta forma, con este primer análisis se corroboró que las células obtenidas de pollo tenían el perfil de expresión descrito para células madre mesenquimales.

(A) AdMSCb



(B) AdMSC p1-2 PASAJE 2



(C) AdMSC p1-2 PASAJE 7

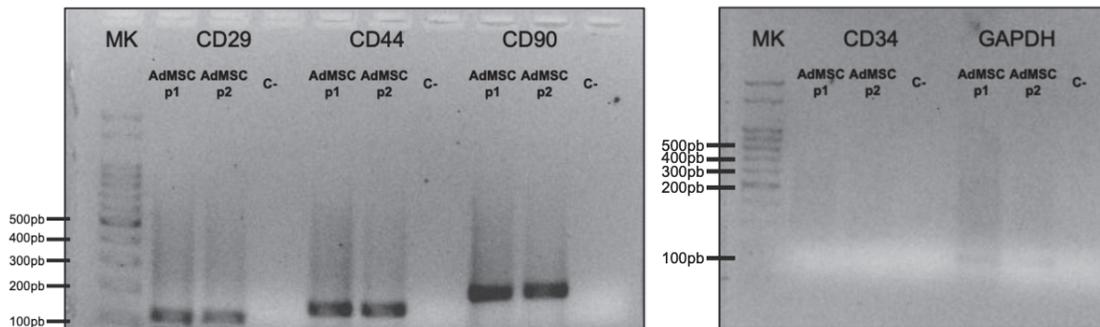


Figura 11: Expresión de marcadores moleculares específicos de AdMSC. (A) Electroforesis en gel de agarosa 2 % m/v donde se indican los genes analizados para una línea de AdMSC bovina (AdMSCb) en pasaje 3. Una línea de fibroblastos bovinos (FB1) fue incluida para comparar el perfil de expresión de este tipo celular con el de AdMSC. Se muestra que la línea AdMSC bovina (AdMSCb) es positiva para los marcadores de célula madre cd29, cd44, cd90, cd166 y cd73, y negativa para los marcadores hematopoyéticos cd45 y cd34. (B) Electroforesis en gel de agarosa 2 % m/v donde se evidencia que las dos líneas de AdMSC de pollo (AdMSCp1 y AdMSCp2) en un pasaje temprano (pasaje 2) expresan los marcadores cd29, cd44, cd90, y no expresan el marcador hematopoyético cd34. (C) Electroforesis

en gel de agarosa 2 % m/v donde se demuestra que las dos líneas de AdMSC de pollo (AdMSCp1 y AdMSCp2) conservan el mismo perfil molecular luego de varios pasajes in vitro (pasaje 7).

Para cada gen se incluyó un control negativo (C-) en donde se colocó agua en lugar de ADNc. Los genes *ywhaz* (120 pb) y *gapdh* (161 pb) fueron utilizados como control de carga. MK: marcador de peso molecular de 100 pb.

4.4 Inducción de la diferenciación de AdMSC de pollo

Habiendo corroborado que las células obtenidas de tejido adiposo tenían la morfología de crecimiento esperada y expresaban marcadores específicos de células madre mesenquimales, el siguiente paso consistió en evaluar la capacidad de las AdMSC de pollo de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteocitos, característica principal de este tipo celular.

Al inducir la diferenciación adipogénica, se observó que la exposición prolongada (más de 2 días) de las células al *cocktail* adipogénico resultaba deletéreo para las mismas. En base a esto, se decidió realizar la diferenciación en forma secuencial, haciendo un breve estímulo con el *cocktail* adipogénico y luego manteniendo el crecimiento celular únicamente en presencia de insulina. Es así que luego de 5 días se logró evidenciar la presencia de gotas lipídicas en el interior celular (en rojo), indicando que la diferenciación logró ser inducida de forma exitosa (Figura 12A). No se observó la presencia de gotas lipídicas en la condición control.

A continuación, se evaluó la potencialidad de las células de originar condrocitos. Como se puede observar en la Figura 12B, las células que fueron expuestas al medio de inducción condrogénica exhibieron la presencia de proteoglicanos (en azul), característica principal de este tipo celular, mientras que no se observó coloración en la condición control.

Posteriormente, se analizó la capacidad de las células de diferenciarse a osteocitos. Luego de 21 días en cultivo, se observó una tinción rojiza, correspondiente a los depósitos de calcio característicos de este linaje celular (Figura 12C). El cultivo tratado exhibía claras diferencias en comparación con el cultivo control. La falta de depósitos de calcio, evidenciada por la ausencia de coloración, valida la ausencia del proceso de diferenciación en la condición control.

Finalmente, y con el fin de asegurarnos de que las células conservaran su fenotipo luego de varios pasajes *in vitro*, se evaluó nuevamente la capacidad de diferenciación de las mismas cuando las células se encontraban en un pasaje alto (pasaje 9). Se observó que al igual que para el perfil de expresión, la capacidad de diferenciación de las AdMSC de pollo no se vio alterado, indicando que las células conservaban su capacidad multipotente por largos períodos de tiempo (Fig. 12).

Cabe mencionar que se obtuvieron resultados similares cuando se evaluó la diferenciación hacia los tres linajes en la especie de referencia (Fig. 13).

En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que las células aisladas de tejido adiposo de pollo poseen la capacidad de originar adipocitos, condrocitos y osteocitos y que esta capacidad multipotente está conservada por numerosos pasajes *in vitro*.

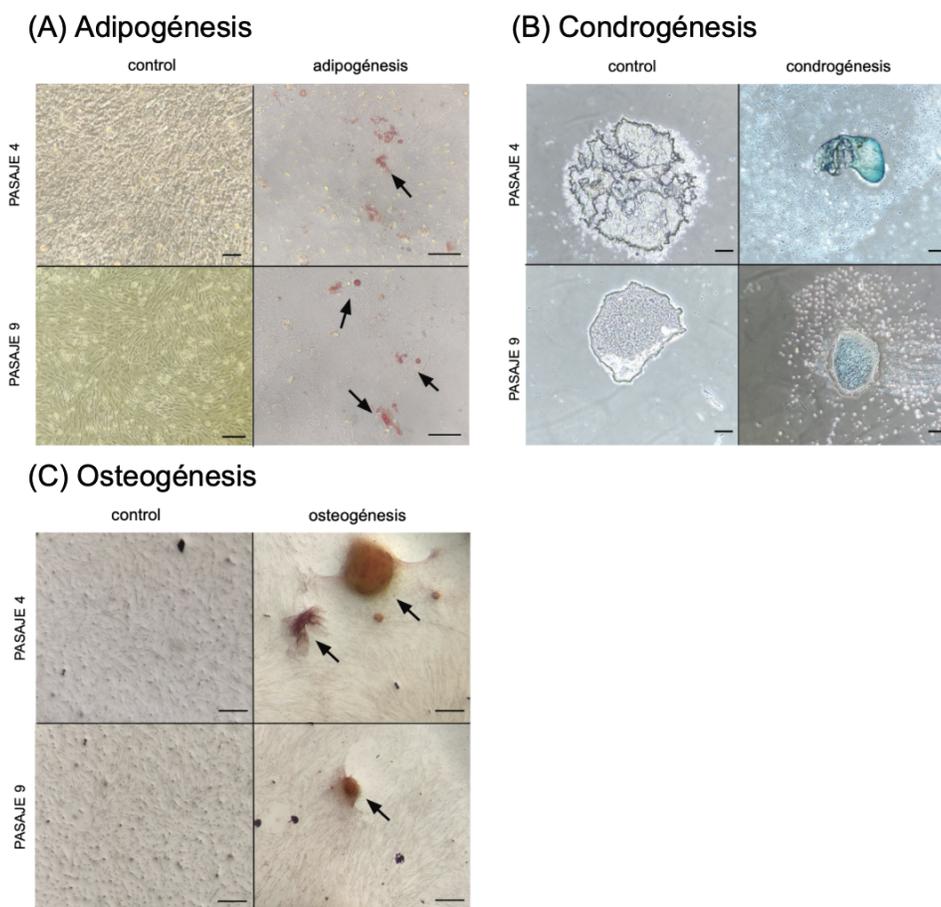


Figura 12: Diferenciación de las AdMSC de pollo a adipocitos, condrocitos y osteocitos. (A) Imágenes en campo claro de AdMSC de pollo teñidas con Oil Red O en la condición control y luego de inducir la

diferenciación hacia el linaje adipogénico. En rojo se observan las gotas lipídicas en el interior celular (señaladas por flechas). (B) Imágenes en campo claro de AdMSC de pollo teñidas con Alcian blue en la condición control y luego de inducir la diferenciación hacia el linaje condrogénico. En azul se evidencian los proteoglicanos. (C) Imágenes en campo claro de AdMSC de pollo teñidas con Alizarin Red en la condición control y luego de inducir la diferenciación hacia el linaje osteogénico. En rojo se observan los depósitos de calcio (señalados por flechas).

La inducción de la diferenciación a adipocitos, condrocitos y osteocitos fue realizada en pasaje 4 y 9. Dos líneas independientes de AdMSC de pollo fueron evaluadas. En todas las imágenes la escala corresponde a 100 μm , excepto en (C) que corresponde a 500 μM .

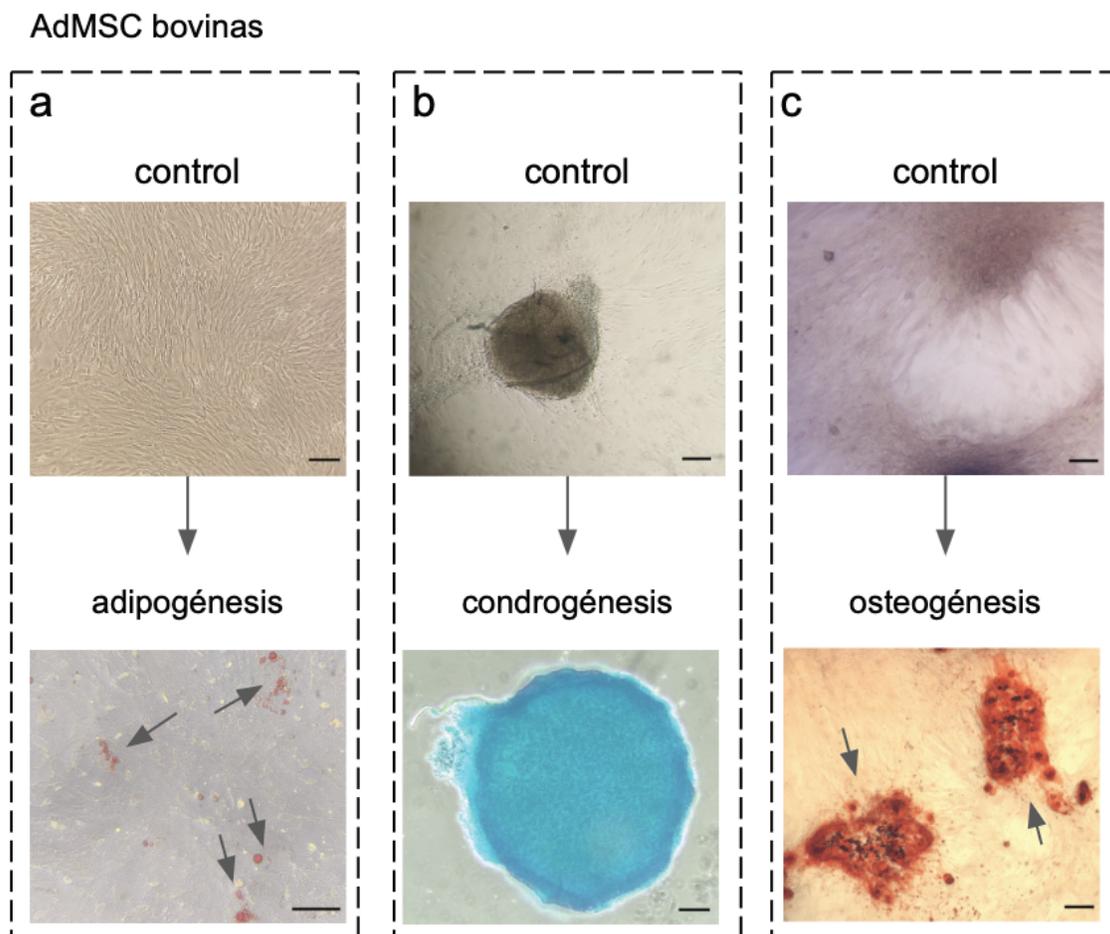


Figura 13: Diferenciación de las AdMSC bovinas a adipocitos, condrocitos y osteocitos. (A) Imágenes en campo claro de AdMSC bovinas teñidas con Oil Red O en la condición control y luego de inducir la diferenciación hacia el linaje adipogénico. En rojo se observan las gotas lipídicas en el interior celular

(señaladas por flechas). (B) Imágenes en campo claro de AdMSC bovinas teñidas con Alcian blue en la condición control y luego de inducir la diferenciación hacia el linaje condrogénico. En azul se evidencian los proteoglicanos. (C) Imágenes en campo claro de AdMSC bovinas teñidas con Alizarin Red en la condición control y luego de inducir la diferenciación hacia el linaje osteogénico. En rojo se observan los depósitos de calcio (señalados por flechas). En todas las imágenes la escala corresponde a 100 μm .

4.5 Aislamiento, cultivo *in vitro* y diferenciación de AdMSC de aves silvestres

Los protocolos de aislamiento, cultivo *in vitro* y diferenciación puestos a punto en muestras de tejido adiposo de pollos fueron evaluados en especies de aves silvestres. En concordancia con los resultados anteriores, no se lograron aislar células de carancho, chimango y caraú (destinados para consumo interno de ejemplares del ecomarque) al emplear el método de digestión enzimática para aislar AdMSC de cantidades de grasa menores a los 3 g, incluso variando el tiempo de digestión (Tabla 4). Sin embargo, este método fue útil cuando se procesaron cantidades mayores a 3 g, logrando obtener células luego de digerir 4 g de tejido adiposo de pavo real. En el caso del flamenco, no fue posible obtener células a pesar de haber procesado una gran cantidad de grasa (7,8 g) (Tabla 4).

Al emplear el método de explantos digeridos enzimáticamente de manera parcial desarrollado en esta tesis, fue posible recuperar AdMSCs a partir de cantidades menores a 3 g, habiéndose logrado aislar células de gavián mixto luego de procesar tan sólo 0,045 g de tejido graso (Tabla 4).

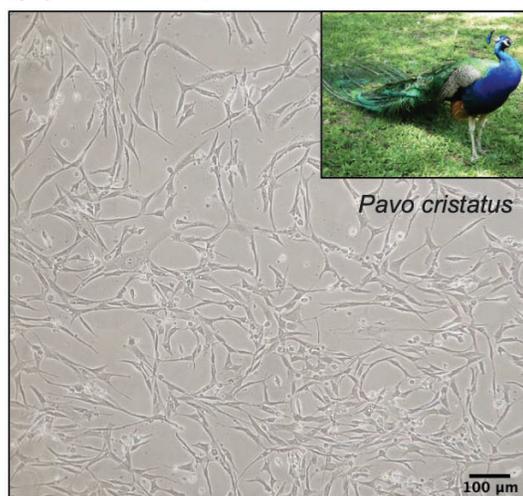
Tabla 4: Resultados obtenidos luego de evaluar diferentes métodos de extracción de AdMSCs en aves silvestres.

Individuo	Método de extracción	Peso muestra inicial	Tiempo de digestión	Cultivo exitoso?
Flamenco	Digestión enzimática	7,8 g	1 h	NO
Carancho	Digestión enzimática	0,4 g	30 min	NO
Chimango	Digestión enzimática	1,22 g	30 min	NO

Caraú	Digestión enzimática	1,07 g	30 min	NO
Pavo real (<i>P.cristatus</i>)	Digestión enzimática	4 g	1 h	SI
Gavilán mixto (<i>P.unicinctus</i>)	Explantos + digestión	0,045 g	20 min	SI

De esta forma, se pudieron aislar células de *P. cristatus* y *P. unicinctus* que crecieron en adherencia con una morfología ahusada o tipo fibroblastoide (Fig. 14A-B).

(A) AdMSC de pavo real P1



(B) AdMSC de gavilán mixto P3

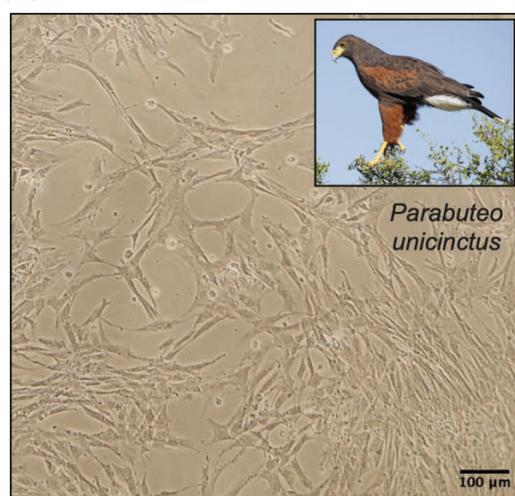


Figura 14: Morfología de crecimiento de células aisladas de tejido adiposo de especies de aves silvestres en diferentes pasajes. (A) Imagen en campo claro de AdMSC en pasaje 1 (P1) de *P. cristatus*. (B) Imagen en campo claro de AdMSC en pasaje 3 (P3) de *P. unicinctus*.

Una vez obtenidas las células con la morfología esperada, el siguiente paso consistió en caracterizarlas mediante el análisis de marcadores moleculares específicos de células madre mesenquimales y mediante la determinación del potencial de diferenciación.

Se comenzó por determinar la presencia de los marcadores *cd29*, *cd44* y *cd90* y la ausencia del marcador hematopoyético *cd34*. Debido a que los genomas de las aves silvestres con los que se trabajó no se encuentran disponibles, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados anteriormente

para *Gallus gallus domesticus*, infiriendo que los genes a analizar se encuentran conservados entre las especies de aves.

Luego de la amplificación de los genes mencionados, se observó que las AdMSC de *P. cristatus* y *P. uncinctus* eran positivas para *cd29* (119 pb), *cd44* (155 pb) y *cd90* (205 pb), corroborando que estos marcadores están conservados entre las especies, y que las células aisladas tenían un perfil molecular que coincidía con la identidad de células madre mesenquimales (Fig. 15). Sin embargo, al analizar el marcador hematopoyético *cd34* (239 pb), se encontró que *P. uncinctus* era negativo para este marcador, mientras que *P. cristatus* resultó positivo (Fig. 15). Debido a que este marcador es característico del linaje hematopoyético y no es específico de AdMSC, se considera que algunas células derivadas del tejido conectivo se encontraban presentes en el cultivo, posiblemente debido a que el perfil molecular de *P. cristatus* fue evaluado en un pasaje temprano (pasaje 1).

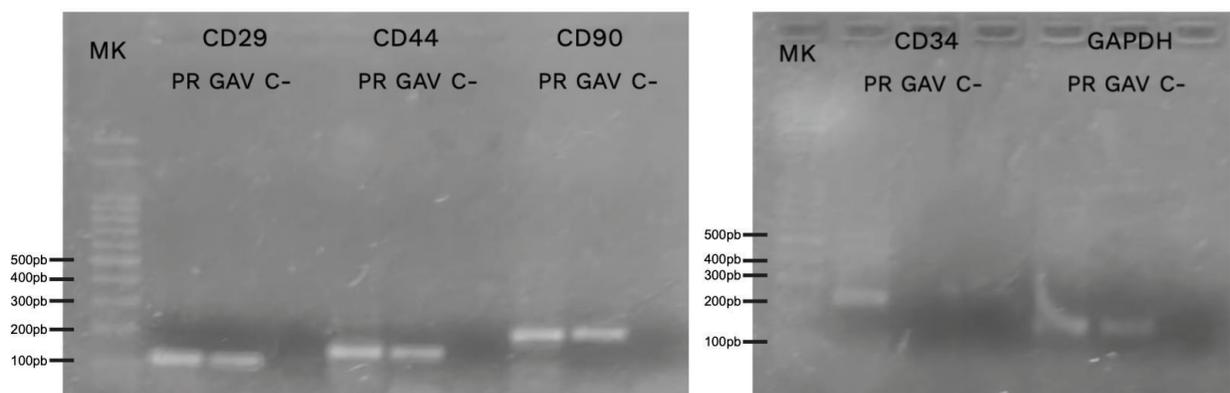


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v que muestra los genes analizados para AdMSC de *P. cristatus* (PV) en pasaje 1, y *P. uncinctus* (GAV) en pasaje 3. Para cada gen analizado, se incluyó un control negativo (C-) en donde se colocó agua en lugar de ADNc. El gen *gapdh* fue utilizado como control de carga. MK: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Luego de determinar el perfil molecular de las células aisladas, se continuó por analizar la capacidad de diferenciación de las células obtenidas de *P. cristatus* y *P. uncinctus*. Utilizando las mismas condiciones, inhibidores y factores de crecimiento empleados para diferenciar a las AdMSCs de pollo, fue posible diferenciar a las células aisladas de *P. cristatus* y *P. uncinctus* en las principales líneas mesodérmicas: adipocitos, condrocitos y osteocitos (Fig. 16), demostrando que

las vías de señalización para inducir la diferenciación hacia los distintos linajes se encuentran conservadas entre las distintas especies, y evidenciando la multipotencialidad de las células obtenidas.

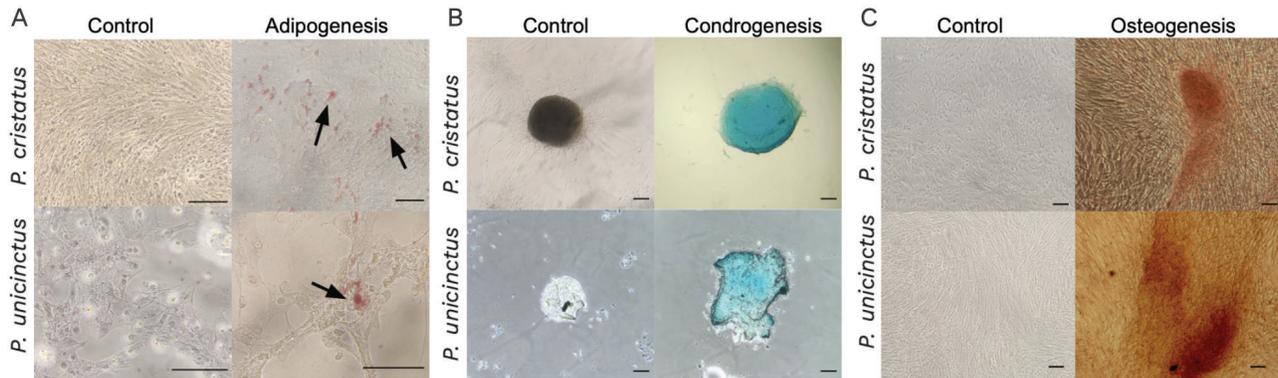


Figura 16: Diferenciación de AdMSC de *P. cristatus* y *P. uncinatus*. (A) Imágenes de microscopía en campo claro de AdMSCs teñidas con Oil red O en la condición de control y después de inducir la diferenciación hacia el linaje adipogénico en *P. cristatus* (pasaje 5) y *P. uncinatus* (pasaje 7). En color rojo, se observan las gotas lipídicas dentro de las células (señaladas por flechas). (B) Imágenes de microscopía en campo claro de AdMSCs teñidas con Alcian Blue en la condición de control y después de inducir la diferenciación hacia el linaje condrogénico en *P. cristatus* (pasaje 3) y *P. uncinatus* (pasaje 6). Los proteoglicanos se visualizan en color azul. (C) Imágenes de microscopía en campo claro de AdMSCs teñidas con Alizarin Red en la condición de control y después de inducir la diferenciación hacia el linaje osteogénico en *P. cristatus* (pasaje 3) y *P. uncinatus* (pasaje 6). Los depósitos de calcio se visualizan en color rojo. Las barras de escala representan 100 μ m.

En conjunto, fue posible aislar AdMSC de las especies *P. cristatus* y *P. uncinatus*, las cuales corroboraron su identidad de célula madre mesenquimal ya que tenían la morfología y el perfil molecular esperado, y podían ser diferenciadas a osteocitos, condrocitos y adipocitos.

4.5.1 Águila coronada

Habiendo logrado aislar AdMSC de especies silvestres y corroborado que las mismas tenían el fenotipo esperado, se buscó aplicar la metodología empleada en las distintas especies de pollos y aves silvestres para obtener AdMSC de águila coronada. Para la obtención de AdMSC de esta especie, se utilizó un ejemplar hembra denominado “Francis” de águila coronada que se encuentra en el Ecoparque interactivo de la Ciudad de Buenos Aires, el cual posee el húmero fracturado producto de un disparo de arma de fuego. El tejido adiposo fue extraído mediante cirugía de la zona intraperitoneal del abdomen del animal (Fig. 17A-B).

Tras la cirugía, el águila pudo recuperarse rápida y exitosamente, demostrando que su salud no se vió puesta en peligro por este procedimiento. Se lograron obtener 0,6 g de tejido adiposo el cual tenía una consistencia acuosa, viscosa y poco vascularizada al igual que el tejido adiposo de las otras especies de aves estudiadas (Fig. 17A-B). El tejido fue procesado mediante la técnica de explantos parcialmente digeridos, y luego de 48 h, se comenzaron a observar células en crecimiento las cuales poseían el fenotipo esperado: morfología ahusada tipo fibroblastoide y crecían en adherencia (Fig. 17C). Sin embargo, al cabo de 4 días en cultivo, las células detuvieron su crecimiento y comenzaron a entrar en senescencia, por lo que no fue posible continuar con el cultivo celular. Estos resultados indicaron que el método de extracción propuesto fue exitoso, pero que aún era necesario optimizar las condiciones de cultivo para esta especie.

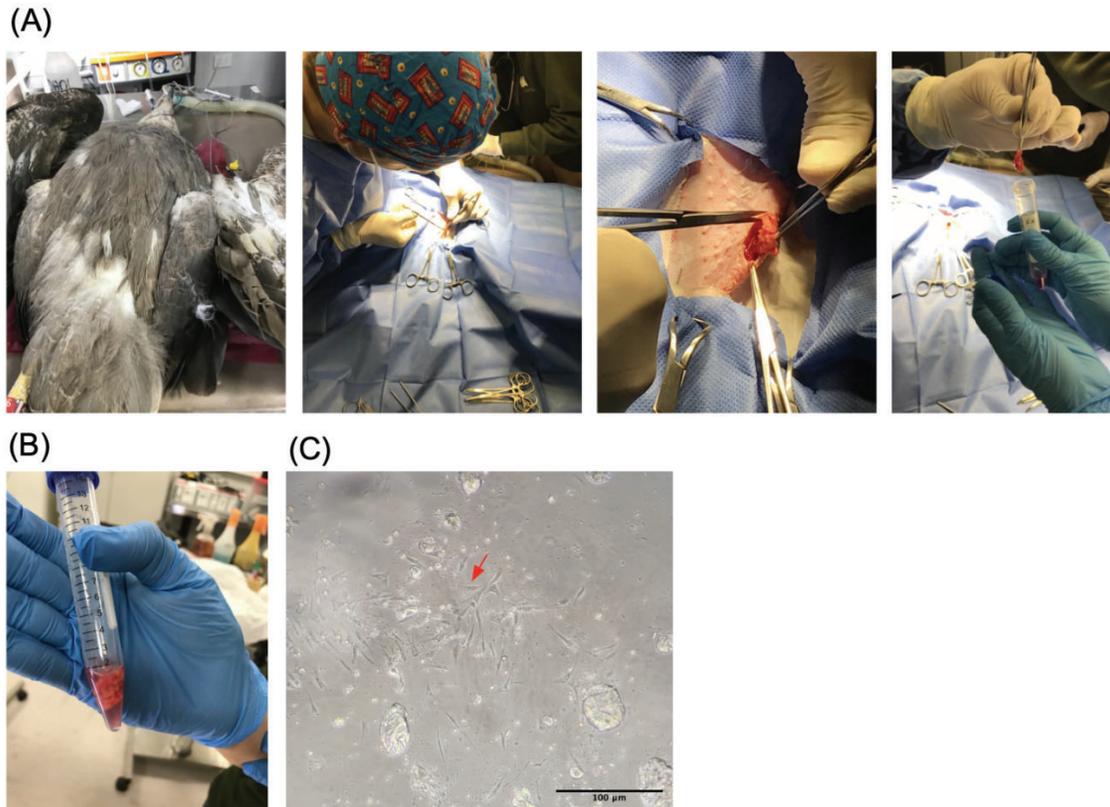


Figura 17: Extracción de AdMSC de águila coronada. (A) Imágenes de la cirugía del ejemplar “Francis” de águila coronada realizada por los veterinarios del Ecoparque de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se extrajeron 0,6 g de tejido adiposo de la zona intraperitoneal del abdomen. (B) El tejido extraído se transportó al laboratorio en DMEM F12 suplementado con antibióticos. (C) Imagen en campo claro de las células tras 48 h de cultivo. La flecha roja indica las células adherentes con la morfología deseada.

Se decidió realizar un nuevo procedimiento de extracción de tejido adiposo pero, en este caso, se buscó enriquecer el medio de cultivo celular para favorecer el crecimiento de las células. Para ello, se incluyó en la formulación del medio al factor FGF, factor que promueve la proliferación celular al aumentar la actividad mitótica y síntesis de ADN (Boonstra y col., 1995; Yun y col., 2010). En esta segunda repetición, se obtuvieron 1,408 g de tejido adiposo y se cultivaron los explantos parcialmente digeridos en presencia del medio suplementado con FGF. Luego de 12 días, se pudo observar crecimiento celular con la morfología esperada (Fig. 18). Las células obtenidas pudieron ser expandidas por más de 6 pasajes *in vitro* y criopreservadas con una tasa de

supervivencia post criopreservación del 70 %. De esta forma, y luego de la inclusión de FGF en el medio de cultivo, fue posible obtener células de águila coronada las cuales, en base a su morfología de crecimiento, podrían ser células madre mesenquimales. Sin embargo, aún es necesario evaluar su perfil molecular y capacidad de diferenciación para poder confirmar su identidad.

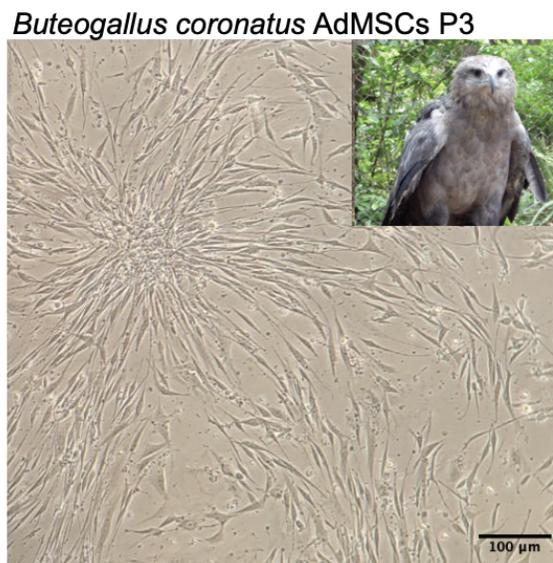


Figura 18: Imagen en campo claro de células aisladas de tejido adiposo de Buteogallus coronatus en pasaje 3.

Los resultados expuestos a lo largo de este trabajo indican que la metodología desarrollada en este trabajo permitió aislar AdMSC de distintos ejemplares de aves, incluyendo pollos y aves silvestres como gavilán mixto, pavo real y finalmente águila coronada.

4.6 Confección de biobanco de AdMSC de aves silvestres

Las AdMSC obtenidas de las distintas especies de aves silvestres fueron amplificadas y criopreservadas en distintos pasajes para confeccionar un biobanco de AdMSC, con el fin de que queden disponibles para futuras investigaciones y desarrollo de terapias regenerativas en ejemplares que sean rescatados por el centro de rescate del Ecoparque. A continuación, se exhibe en la Tabla 5,

la cantidad de viales de las muestras criopreservadas en distintos pasajes y su concentración, para las distintas especies de aves silvestres.

Tabla 5: Biobanco de AdMSC de especies de aves silvestres.

Especie	Número de viales	Pasaje	Concentración
<i>P. unicinctus</i>	5	3 viales pasaje 6 2 viales pasaje 0	1.2 x 10 ⁶ células/mL cada vial
<i>P. cristatus</i>	3	2 viales pasaje 1 1 vial pasaje 0	1.2 x 10 ⁶ células/mL cada vial
<i>B. coronatus</i>	10	6 viales pasaje 4	5 x 10 ⁵ células/mL
		4 viales pasaje 5	1.1 x 10 ⁶ células/mL

Si bien al día de la fecha únicamente se cuenta con células de tres especies de aves silvestres, se proyecta extender el repertorio del biobanco con nuevos ejemplares que lleguen al Ecoparque. Según nuestro conocimiento, estos resultados forman parte del primer biobanco de AdMSC de especies de aves silvestres confeccionado a nivel mundial.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

La conservación de la vida silvestre es la práctica de proteger las especies vegetales y animales, y sus hábitats. Como parte de los ecosistemas mundiales, la vida silvestre proporciona equilibrio y estabilidad a los procesos naturales. El objetivo de la conservación de la vida silvestre es asegurar la supervivencia de éstas especies y educar a las personas sobre cómo vivir de manera sostenible con las demás especies.

Según los últimos datos reportados por el Banco mundial, la población humana ha crecido exponencialmente en los últimos 200 años, superando los 8 mil millones de personas hoy en día, y continúa creciendo rápidamente. Esto significa que los recursos naturales se están consumiendo más rápido que nunca, por miles de millones de personas en el planeta. Este crecimiento y desarrollo también pone en peligro los hábitats y la existencia de diversos tipos de vida silvestre en todo el mundo, especialmente la de animales y plantas (Ceballos y col., 2017; Dirzo and Raven, 2003). Otras amenazas para la vida silvestre también incluyen la introducción de especies invasoras de otras partes del mundo, el cambio climático, la contaminación, la pesca y la caza furtiva.

Dentro del grupo animal, las especies de aves rapaces están especialmente amenazadas. Las aves rapaces, o aves de presa, participan en la dinámica de las comunidades ecológicas del bioma que habitan. Estas especies se encuentran como depredadores al tope de las cadenas tróficas (Sergio y col., 2008), determinando los patrones estructurales de las comunidades ecológicas en las que participan (Bildstein, 2005). No obstante, por ser especies poco abundantes y con necesidad de territorios amplios, es que son sumamente vulnerables a cambios ambientales (Jullien y col, 1996). De las 557 especies de aves rapaces identificadas, el 52 % tiene a sus poblaciones en declive y el 18 % está en peligro de extinción (McClure y col., 2018).

El águila coronada, es una especie de ave rapaz que habita la zona sur y central de América del Sur, y es una de las águilas más grandes de Argentina. Se estima que existe una población global con una cantidad menor a los 1000 individuos, con una tendencia decreciente, y según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza está catalogada como en vías de extinción. Ante este escenario, el Ecoparque Interactivo de Ciudad Autónoma de Buenos Aires conformó el proyecto titulado “Conservación del águila coronada” que busca rescatar ejemplares de esta especie junto con otras aves silvestres que se encuentren heridas, para reinsertarlas en su hábitat natural o, en caso de no ser posible su reinsertión, utilizarlas para su reproducción en cautiverio para

proporcionar un número suficiente de animales sanos para ayudar a restaurar la especie en la naturaleza.

Generalmente, los ejemplares de águila coronada llegan al Ecoparque con heridas en sus alas y la regeneración tisular se ve seriamente afectada y no puede ser revertida por métodos convencionales, haciendo evidente la necesidad de encontrar terapias alternativas. En numerosas especies de mamíferos como vacas, cabras y ovejas, la terapia celular con células madres mesenquimales ha demostrado ser efectiva para la regeneración tisular (Hill y col., 2019; Esteves y col., 2017; Minter y col., 2012; Harness y col., 2022). Las MSC constituyen el tipo celular más elegido para su aplicación veterinaria debido a que se expanden rápidamente *in vitro* (Baksh y col., 2004), son capaces de promover la regeneración tisular (Salgado y col., 2010, Yu y col., 2019) y de diferenciarse a tejidos como hueso, cartílago y grasa (Kern y col., 2006), y no montan una respuesta inmune severa pudiendo ser utilizadas de manera heteróloga entre individuos de una misma especie (Khang y col., 2007). A pesar de las ventajas que estas células presentan, aún no existen terapias celulares puestas en práctica en aves, e incluso existe escasa información acerca del aislamiento y cultivo de AdMSC de pollos. Teniendo lo anterior como fundamento, el objetivo del presente trabajo de tesis de licenciatura fue desarrollar y optimizar protocolos de extracción, cultivo *in vitro* y caracterización de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de aves, con la meta de confeccionar un biobanco para que las células queden disponibles para su utilización en terapias celulares para la regeneración de tejidos, contribuyendo en última instancia, a la conservación de la vida silvestre aviar.

Las MSC pueden encontrarse en numerosos tejidos de un organismo entre los cuales los más frecuentemente elegidos para su obtención son la médula ósea, el cordón umbilical, y el tejido adiposo. En humanos, las MSC derivadas de tejido adiposo demostraron tener como ventaja que poseen un gran potencial proliferativo, y son capaces de inducir efectos inmunomodulatorios de manera más eficiente en comparación con MSC extraídas de médula ósea (Li y col., 2015). Además, estas células son abundantes en la grasa, constituyendo el 2 % de la población celular del tejido adiposo, mientras que MSC de otros tejidos como de médula ósea constituyen el 0,002 % de la población celular (Figiel y col., 2022). Asimismo, las AdMSC cuentan con la ventaja de que pueden ser obtenidas de individuos adultos a partir de intervenciones quirúrgicas menores. En pollos, existen reportes en los que se lograron aislar MSC de médula ósea, grasa, fémur, huesos compactos,

pulmón y tejido conjuntivo embrionario (Khatri y col., 2009; Gong y col., 2011; Adhikari y col., 2019; Bai y col., 2013; Wang y col., 2018). Según lo reportado, las MSC aisladas de fémur demostraron un mayor rendimiento en cuanto a la cantidad de células obtenidas por la cantidad de tejido procesado (Adhikari y col., 2019). Sin embargo, considerando que en el presente trabajo se buscó preservar al ejemplar animal, esta fuente de MSC no constituye una opción viable. Debido a esto y a las ventajas que poseen las AdMSC frente MSC derivadas de otros tejidos, es que durante el presente trabajo se eligió al tejido adiposo como fuente de células madre mesenquimales.

Se comenzó trabajando con muestras de pollos (*Gallus gallus domesticus*) por su fácil accesibilidad y semejanza con las aves silvestres. Debido a que en pollos hay tan sólo un trabajo disponible en la bibliografía acerca de AdMSC (Gong y col., 2011), se decidió comparar los resultados con otras especies en donde los protocolos de aislamiento y cultivo *in vitro* de AdMSC ya se encuentren establecidos, eligiendo a la especie bovina como organismo modelo (Oyarzo y col., 2021; Ferrin y col., 2017).

Se probaron tres métodos para aislar AdMSC: el método enzimático, el método de explantos y el método desarrollado en esta tesis de “explantos parcialmente digeridos”. El método enzimático ha sido utilizado previamente para obtener AdMSC de pollos (Gong y col., 2011) y otras especies (Ciufredda y col., 2016), mientras que el empleo del método de explantos sólo fue reportado en la especie humana para la obtención de AdMSC (Hendijani., 2017). En ambos trabajos, no se mencionó la cantidad de tejido adiposo inicial utilizado para obtener AdMSC. Nuestros resultados demostraron que, empleando el método de digestión enzimática, fue posible aislar AdMSC de manera exitosa cuando se procesaron 4,5g o más de tejido adiposo. Debido a que se buscó realizar mínimas intervenciones quirúrgicas al ave de interés de conservación, se buscó optimizar el proceso de extracción de AdMSC partiendo de pequeñas cantidades de tejido adiposo. No obstante, se observó que el método enzimático no era adecuado para aislar células partiendo de cantidades menores a los 3 g, aún variando los tiempos de digestión. Resultados similares fueron observados para la especie de referencia *Bos taurus*, donde los cultivos de AdMSC exitosos partieron de cantidades iguales o mayores a los 5 g. En el método de digestión enzimática, se realizan tres centrifugaciones sucesivas, proceso que está reportado que podría afectar la viabilidad celular de las pequeñas poblaciones celulares que constituyen al tejido (Hendijani., 2017). En base a estos resultados, se decidió utilizar el método de explantos para aislar AdMSC de pequeñas cantidades de

tejido adiposo inicial. Este método no involucra centrifugaciones, y ha sido propuesto como un método más suave y beneficioso para la viabilidad celular (Hendijani., 2017). Sin embargo, este método tampoco fue adecuado para aislar AdMSC, posiblemente debido a que el tejido adiposo aviar posee una viscosidad que podría imposibilitar que las células escapen fácilmente del tejido. Debido a que la estructura del tejido adiposo presenta distintas características dependiendo de la zona corporal y de la especie de donde se obtenga, sería interesante estudiar si existe relación entre la fisiología del tejido y el rendimiento de obtención de AdMSC.

Considerando los resultados anteriores, se decidió evaluar un nuevo método de extracción, que consistía en la combinación de los métodos anteriores, al que se lo denominó “explantos digeridos enzimáticamente de manera parcial”. La utilización de este método permitió recuperar AdMSC de cantidades menores a los 3 g de grasa, siendo posible recuperar AdMSC luego de procesar un mínimo de 0,02 g de tejido adiposo inicial. Se considera que este método permitió disgregar suficientemente al tejido para permitir el escape de las AdMSC hacia la superficie de la placa de cultivo, conservando las propiedades bioquímicas y biomecánicas del tejido, sin estresar de forma excesiva a las células. De esta forma, se logró establecer que para cantidades mayores a los 5 g de tejido adiposo, el método enzimático era adecuado para lograr recuperar AdMSC, mientras que para cantidades menores, el método de explantos parcialmente digeridos era más conveniente. Siguiendo esta metodología, se logró aislar por primera vez AdMSC de especies de aves silvestres como *Parabuteo unicinctus* (gavilán mixto) y *Buteogallus coronatus* (águila coronada). También se logró aislar por primera vez AdMSC de *Pavo cristatus* (pavo real) empleando el método de digestión enzimática. Algo relevante a mencionar es que no se pudo obtener AdMSC de flamenco, aún habiendo partido de grandes cantidades de grasa (7,8 g). Según pruebas realizadas en humanos, existe una dependencia entre la eficacia no sólo de la extracción sino también del potencial terapéutico de estas células con respecto a la edad del individuo (Chen y col., 2022). Particularmente, el ejemplar de flamenco utilizado era un animal de edad avanzada lo cual podría explicar los resultados obtenidos.

Habiendo logrado estandarizar los procedimientos de extracción, se continuó con la optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* de las AdMSC de pollos. Para ello se evaluaron tres medios basales que son ampliamente utilizados para el cultivo de AdMSC en otras especies como el DMEM F12, y el DMEM alto y bajo en glucosa (Ayatollahi y col., 2012; Svoradova y col.,

2021; Hendijani y col., 2016; Cooper y col., 2010) y se midió el PDT. Los resultados obtenidos, con relevancia estadística, demostraron que el DMEM F12 era el medio más conveniente para cultivar de manera *in vitro* este tipo celular ya que devolvió un PDT menor, con respecto a los otros dos medios evaluados. El medio DMEM F12 es un medio rico que posee una concentración de 4,5 g/L de glucosa y componentes como biotina, putrescina, ácido lipoico, glicina, prolina, cobre, zinc y hierro; componentes que estimulan la proliferación celular (Chaudhry y col., 2008) y que el DMEM basal no posee. Si bien la presencia de glucosa ha sido asociada con una mayor proliferación celular en otras especies y tipos celulares (Deorosan y col., 2011), ésta no sería la responsable de un PDT menor ya que el DMEM alto en glucosa presenta los mismos niveles de este componente. Sin embargo, podría suceder que la glucosa actúe de forma sinérgica junto con los elementos diferenciales que componen al medio DMEM F12, o que estos componentes diferenciales sean los responsables de proveer a las células de moléculas que aceleran su metabolismo, beneficiando de esta forma la proliferación celular.

Si bien el medio basal DMEM F12 fue adecuado para crecer *in vitro* AdMSC de pollos y de la mayoría de las aves silvestres con las que se trabajó, en el caso de *B. coronatus*, fue necesario suplementar al medio con FGF para poder obtener un cultivo celular estable y en constante crecimiento. El factor FGF mantiene las características “*stem*” de las AdMSC en cultivo, así como también acelera la cinética de la proliferación celular al fosforilar las proteínas ERK/MAP quinasas y provocar la activación de genes involucrados en la regulación del ciclo celular (Cheng y col., 2020). El ejemplar de *B. coronatus* con el que se trabajó se trataba de un individuo adulto, rescatado tras sufrir heridas por armas de fuego en una de sus extremidades anteriores. El plomo es un elemento tóxico para las estructuras orgánicas (Assi y col., 2016), por lo que trazas del mismo podrían haber perjudicado al cultivo de AdMSC *in vitro*, requiriendo de factores que induzcan la proliferación celular como el FGF.

Una vez dilucidado el método de extracción y cultivo de las AdMSC, el siguiente paso consistió en realizar una batería de ensayos para validar la naturaleza de las células. Con este fin, se analizó la morfología de crecimiento *in vitro*, se evaluó la expresión de marcadores moleculares específicos de este tipo celular y se determinó su capacidad multipotente.

Las AdMSCs de pollos presentaron una morfología fibroblastoide, correspondiente con la bibliografía (Gong y col., 2011; Svoradova y col., 2021) y con las observadas para AdMSC de

bovinos y otras especies (Harness y col., 2022). Este mismo patrón de crecimiento fue observado para las células aisladas de pavo real, gavián mixto y águila coronada.

Posteriormente, se procedió con la caracterización molecular de las AdMSC obtenidas para las distintas especies de aves. Dado que únicamente el genoma de *Gallus gallus domesticus* se encuentra disponible, se diseñaron oligonucleótidos para esta especie y los mismos fueron probados en las distintas aves silvestres. Se evaluaron algunos de los marcadores determinados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, entre los cuales *cd29*, *cd44* y *cd90* deberían resultar positivos, y el marcador *cd34* debería resultar negativo, para inferir que el perfil molecular de las células coincidía con el de una célula madre mesenquimal. Al igual que lo reportado en trabajos anteriores de AdMSC y MSC de fémur de pollos (Gong y col., 2011; Adhikari y col., 2019), las AdMSC de pollos y silvestres obtenidas en este trabajo fueron positivas para los marcadores *cd44*, *cd29*, y *cd90* y negativas para el marcador hematopoyético *cd34*, con excepción de *P. uncinatus* en donde este último marcador también resultó positivo. El marcador *cd34* ha sido utilizado para identificar células provenientes de tejido conectivo en pollos (Wang y col., 2022). Debido a que la detección de *cd34* en el cultivo de AdMSC de *P. uncinatus* fue evaluado en un pasaje temprano (pasaje 1), donde el cultivo aún no era homogéneo, se considera que habían algunas células derivadas del tejido conectivo (tejido presente en el tejido adiposo), lo que podría explicar estos resultados. Para corroborar esto, sería adecuado realizar un nuevo análisis de este marcador en pasajes más tardíos para confirmar el perfil molecular de las AdMSC en esta especie. En conjunto, estos resultados indican que los marcadores analizados se encuentran transversalmente conservados entre las especies de aves, y que las AdMSC obtenidas exhiben un perfil molecular semejante con el de célula madre mesenquimal.

Finalmente y como último ensayo de caracterización, se evaluó el potencial de diferenciación de las células obtenidas. Para ello, se indujo la diferenciación de las células hacia los tres linajes mesodérmicos principales: osteocitos, condrocitos y adipocitos, empleando protocolos descritos previamente para otras especies (Silva y col., 2014; Sampaio., 2015; Ciufredda y col., 2016). Por un lado se observó que, similar a lo reportado para AdMSC y MSC de fémur de pollos (Gong y col., 2011; Adhikari y col., 2019), las AdMSC de pollos y aves silvestres obtenidas en este trabajo tenían la capacidad de ser diferenciadas a osteocitos y condrocitos. Llamativamente, la inducción hacia estos dos linajes involucraba la adición de los mismos factores e inhibidores que se

utilizan para otras especies, incluidos mamíferos, denotando que las vías de señalización para modular la diferenciación hacia estos linajes estarían conservadas entre las especies. Sin embargo, en el caso de la diferenciación hacia el linaje adipogénico, se observó que la utilización de los protocolos reportados concluía en la senescencia de las AdMSC de pollos y aves silvestres al cabo de 2-3 días. Estos resultados evidenciaron que algún componente del medio de inducción adipogénico era tóxico para las células. Entre los componentes del medio, el IBMX es un inhibidor que podría estar interfiriendo con la viabilidad celular, lo cual fue demostrado por estudios anteriores, incluso en células cancerígenas (Slotkin y col., 2000). Por esa razón, se decidió realizar una diferenciación secuencial hacia el linaje adipogénico, la cual consistió en utilizar el medio de inducción por 24 horas y luego, mantener el cultivo con medio basal suplementado con insulina, factor que promueve la síntesis lipídica (Santoro y col., 2021). Lo anterior devolvió un cultivo estable, pudiendo observar la presencia de gotas lipídicas en el interior celular, fenotipo característico de este tipo celular (Bosnakovski y col., 2015; Ferrin y col., 2017; Ciufredda y col., 2016; Gong y col., 2011). Otros estudios realizados en humanos, sugieren que la adición de triiodotironina y rosiglitazone al cultivo de MSC inducen una diferenciación más eficiente hacia el linaje adipogénico (Ghoniem y col., 2015), por lo que futuros ensayos determinarán si este mismo efecto podrá ser observado en aves. Por otra parte, cabe destacar que la evaluación del potencial de diferenciación de AdMSC hacia los principales linajes del mesodermo fue evaluado de manera cualitativa, por lo que futuras investigaciones podrían hacer énfasis en la evaluación cuantitativa de este aspecto.

Numerosos factores de las condiciones de cultivo como la confluencia o el cultivo prolongado *in vitro*, pueden concluir en la diferenciación espontánea o transformación de las células (Loh y col., 2011; McBeath y col., 2004), siendo imprescindible confirmar el estado “*stem*” luego de numerosos pasajes. Nuestros resultados demostraron que el fenotipo de las células obtenidas no se vio afectado luego de numerosos pasajes *in vitro*, ya que las mismas conservaron su morfología de crecimiento, perfil molecular y capacidad de diferenciación. Sería interesante acompañar estos resultados con un análisis del cariotipo de las células para terminar de confirmar la estabilidad genómica de las mismas.

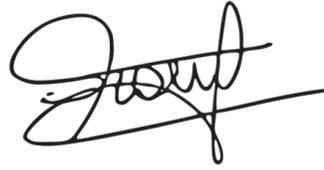
Las líneas celulares obtenidas de AdMSC de *Pavo cristatus*, *Parabuteo unicinctus* y *Buteogallus coronatus* fueron amplificadas y conservadas en nitrógeno líquido conformando el primer biobanco de AdMSC de aves silvestres a nivel internacional, según lo reportado. Este

biobanco se creó con el objetivo de conservar la diversidad genética de estas especies, quedando disponible para futuras investigaciones con diversos enfoques como regeneración de tejidos, conservación de la biodiversidad, para modelado de enfermedades, para el descubrimiento de drogas, y para el monitoreo de la diversidad genética de una misma especie, entre otros. Dentro del área de la regeneración de tejidos, el próximo paso será estudiar la capacidad de las AdMSC de inducir la regeneración tisular *in vivo* en aves. Si bien existen al momento 800 estudios en fase clínica que emplean AdMSC en humanos para la regeneración de tejido músculo-esquelético donde se trata de demostrar la seguridad y la eficacia del tratamiento (Ayala-Cuellar y col., 2019), sería útil evaluar estos factores en aves silvestres para corroborar la seguridad y eficacia en estas especies.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis demuestran la optimización de la extracción de AdMSC, donde el método desarrollado de explantos parcialmente digeridos permitió la obtención de AdMSC de pequeñas cantidades de tejido adiposo de pollos y de las aves silvestres: pavo real, gavilán mixto y águila coronada, un hecho que no había sido reportado previamente según nuestro conocimiento. Además, se demostró que el medio basal DMEM F12 era el más óptimo para el cultivo de AdMSC de aves. Asimismo, se observó que las células obtenidas poseían el fenotipo esperado: morfología fibroblastoide, crecían en adherencia, expresaban marcadores específicos de AdMSC y se diferenciaban a los tres linajes mesodérmicos, validando su naturaleza de células madre mesenquimales. Finalmente, se conformó un biobanco con las AdMSC de aves silvestres, lo cual representa un paso crucial hacia la implementación, por primera vez, de terapias celulares que busquen la regeneración tisular en aves en vías de extinción aportando nuevas estrategias para la biología aplicada a la conservación. Se considera que estos hallazgos no serían exclusivos para las especies de aves estudiadas, pudiendo ser también extrapolables a otras especies aviares.

El presente documento corresponde a la versión final.

Firma del tesista:



Aclaración: Francesca Tiziana Pérez Profeta

Firma del director de tesis:



Aclaración: Micaela Navarro

Fecha: 28 de Mayo, 2024

6. BIBLIOGRAFÍA

Adhikari, Roshan, Chongxiao Chen, Elizabeth Waters, Franklin D. West, and Woo Kyun Kim. "Isolation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Broiler Chicken Compact Bones." *Frontiers in Physiology* 9 (January 22, 2019): 1892. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01892>.

Ando, Wataru, Kosuke Tateishi, David A. Hart, Daisuke Katakai, Yoshinari Tanaka, Ken Nakata, Jun Hashimoto, et al. "Cartilage Repair Using an in Vitro Generated Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Derived from Porcine Synovial Mesenchymal Stem Cells." *Biomaterials* 28, no. 36 (December 2007): 5462–70. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.030>.

Assi MA, Hezmee MN, Haron AW, Sabri MY, Rajion MA. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Vet World*. 2016 Jun;9(6):660-71. doi: 10.14202/vetworld.2016.660-671. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27397992; PMCID: PMC4937060.

Ayala-Cuellar AP, Kang JH, Jeung EB, Choi KC. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019 Jan 1;27(1):25-33. doi: 10.4062/biomolther.2017.260. PMID: 29902862; PMCID: PMC6319543.

Ayatollahi M, Salmani MK, Geramizadeh B, Tabei SZ, Soleimani M, Sanati MH. Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells*. 2012 Jan 26;4(1):1-8. doi: 10.4252/wjsc.v4.i1.1. PMID: 22347527; PMCID: PMC3277873.

Bai C, Li X, Hou L, Zhang M, Guan W, Ma Y. Biological characterization of chicken mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord Wharton's jelly. *Mol Cell Biochem*. 2013 Apr;376(1-2):95-102. doi: 10.1007/s11010-012-1553-y. Epub 2012 Dec 30. Erratum in: *Mol Cell Biochem*. 2013 Apr;376(1-2):199. Li, Xiangcheng [corrected to Li, Xiangchen]. PMID: 23275127.

- Becker, A. J., E. A. McCULLOCH, and J. E. Till. "Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells." *Nature* 197 (February 2, 1963): 452–54. <https://doi.org/10.1038/197452a0>.
- Bildstein, K. 2005. Why migratory birds of prey make great biological indicators. Hawk Mountain Sanctuary, Kempton, Pennsylvania. p. 169–179.
- Blaž Burja, Ariana Barlič, Andreja Erman, Katjuša Mrak-Poljšak, Matija Tomšič, Snezna Sodin-Semrl, Katja Lakota. Human mesenchymal stromal cells from different tissues exhibit unique responses to different inflammatory stimuli. *Current Research in Translational Medicine*. Volume 68, Issue 4, 2020, Pages 217-224. ISSN 2452-3186, <https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.05.006>.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G. et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319, 243–253 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1012-5>.
- Chaudhry, Muhammad A., Timothy Z. Vitalis, Bruce D. Bowen, and James M. Piret. "Basal Medium Composition and Serum or Serum Replacement Concentration Influences on the Maintenance of Murine Embryonic Stem Cells." *Cytotechnology* 58, no. 3 (November 2008): 173–79. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9177-5>.
- Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L. & Daley, G. Q. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res*. 2010 209 20, 982–993 (2010).
- Chen H, Liu O, Chen S, Zhou Y. Aging and Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Opportunities and Challenges in the Older Group. *Gerontology*. 2022;68(3):339-352. doi: 10.1159/000516668. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34161948; PMCID: PMC8985028.
- Cheng, Yin, Kai-Hsuan Lin, Tai-Horng Young, and Nai-Chen Cheng. "The Influence of Fibroblast Growth Factor 2 on the Senescence of Human Adipose-Derived Mesenchymal

Stem Cells during Long-Term Culture.” *Stem Cells Translational Medicine* 9, no. 4 (April 1, 2020): 518–30. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0234>.

Christopher J.W. McClure, James R.S. Westrip, Jeff A. Johnson, Sarah E. Schulwitz, Munir Z. Virani, Robert Davies, Andrew Symes, Hannah Wheatley, Russell Thorstrom, Arjun Amar, Ralph Buij, Victoria R. Jones, Nick P. Williams, Evan R. Buechley, Stuart H.M. Butchart, State of the world's raptors: Distributions, threats, and conservation recommendations, *Biological Conservation*, Volume 227, 2018, Pages 390-402, ISSN 0006-3207, <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.08.012>.

Ciuffreda, Maria Chiara, Giuseppe Malpasso, Paola Musarò, Valentina Turco, and Massimiliano Gnechi. “Protocols for in Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages.” In *Mesenchymal Stem Cells*, edited by Massimiliano Gnechi, 1416:149–58. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_8.

“Conservación | Buenos Aires Ciudad - Gobierno de La Ciudad Autónoma de Buenos Aires.” Accessed March 17, 2024. <https://buenosaires.gob.ar/ecoparque/conservacion>.

Connolly, John F. “Clinical Use of Marrow Osteoprogenitor Cells to Stimulate Osteogenesis.” *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355S (October 1998): S257–66. <https://doi.org/10.1097/00003086-199810001-00026>.

Cooper K, SenMajumdar A, Viswanathan C. Derivation, expansion and characterization of clinical grade mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix using cord blood serum. *Int J Stem Cells*. 2010 May;3(2):119-28. doi: 10.15283/ijsc.2010.3.2.119. PMID: 24855549; PMCID: PMC4021805.

David P. Clark, Nanette J. Pazdernik. *Cloning and Stem Cells. Biotechnology (Second Edition)*, 2016.

- Dashty Rahmatabady, Monireh. (2014). Differential role of AMP-activated protein kinase in brown and white adipose tissue components and its consequences in metabolic diseases. *Journal of Diabetes & Metabolism*.
- Dazzi and Krampera. (2011). Mesenchymal Stem Cells and Autoimmune Diseases. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. Volume 24, pages 49-57. ISSN: 10.1016/j.beha.2011.01.002. doi:10.1016/j.beha.2011.01.002.
- Deorosan B, Nauman EA. The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*. 2011;2011:429187. doi: 10.4061/2011/429187. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21603146; PMCID: PMC3096318.
- Ding, Dah-Ching, Woei-Cherng Shyu, and Shinn-Zong Lin. "Mesenchymal Stem Cells." *Cell Transplantation* 20, no. 1 (February 1, 2011): 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8, no. 4 (2006): 315–17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dufrane, Denis, Pierre-Louis Docquier, Christian Delloye, Hélène A. Poirel, Wivine André, and Najima Aouassar. "Scaffold-Free Three-Dimensional Graft From Autologous Adipose-Derived Stem Cells for Large Bone Defect Reconstruction: Clinical Proof of Concept." *Medicine* 94, no. 50 (December 2015): e2220. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002220>.
- Ferrin, Izaskun, Izaskun Beloqui, Lorea Zabaleta, Juan M. Salcedo, Cesar Trigueros, and Angel G. Martin. "Isolation, Culture, and Expansion of Mesenchymal Stem Cells," 177–90, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0_13.

Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol.* 2010;695:155-68. doi: 10.1007/978-1-4419-7037-4_11. PMID: 21222205; PMCID: PMC4020242.

Figiel-Dabrowska, Anna, Natalia E. Krzesniak, Bartłomiej H. Noszczyk, Krystyna Domanska-Janik, and Anna Sarnowska. "Efficiency Assessment of Irrigation as an Alternative Method for Improving the Regenerative Potential of Non-healing Wounds." *Wound Repair and Regeneration* 30, no. 3 (May 2022): 303–16. <https://doi.org/10.1111/wrr.13013>.

Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova. "Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues." *Transplantation* 6, no. 2 (March 1968): 230–47.

G. Ceballos, P.R. Ehrlich, R. Dirzo. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines, *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201704949 (2017).

Ghoniem, Amir-Alexander, Yahya Açil, Jörg Wiltfang, and Matthias Gierloff. "Improved Adipogenic in Vitro Differentiation: Comparison of Different Adipogenic Cell Culture Media on Human Fat and Bone Stroma Cells for Fat Tissue Engineering." *Anatomy & Cell Biology* 48, no. 2 (2015): 85. <https://doi.org/10.5115/acb.2015.48.2.85>.

Goligorsky, Michael S. *Regenerative Nephrology*. 1st ed. Amsterdam Boston: Elsevier/Academic Press, 2011.

Gong, Xuelian, Lingling Hou, Chunyu Bai, Dapeng Jin, Xiaohong He, Weijun Guan, and Yuehui Ma. "Isolation and Biological Characteristics of Chicken Adipose-Derived Progenitor Cells." *DNA and Cell Biology* 30, no. 7 (July 2011): 453–60. <https://doi.org/10.1089/dna.2010.1154>.

Grompe, Markus. "Adult versus Embryonic Stem Cells: It's Still a Tie." *Molecular Therapy* 6, no. 3 (September 2002): 303–5. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0687>.

- Han, Yu, Xuezhou Li, Yanbo Zhang, Yuping Han, Fei Chang, and Jianxun Ding. “Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine.” *Cells* 8, no. 8 (August 13, 2019): 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>.
- Harness, Ellen M., Nuradilla Binti Mohamad-Fauzi, and James D. Murray. “MSC Therapy in Livestock Models.” *Translational Animal Science* 6, no. 1 (January 2022): <https://doi.org/10.1093/tas/txac012>.
- Hendijani, Fatemeh. “Explant Culture: An Advantageous Method for Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Tissues.” *Cell Proliferation* 50, no. 2 (April 2017): e12334. <https://doi.org/10.1111/cpr.12334>.
- Hernigou, Philippe, and Françoise Beaujean. “Treatment of Osteonecrosis With Autologous Bone Marrow Grafting.” *Clinical Orthopaedics and Related Research* 405 (December 2002): 14–23. <https://doi.org/10.1097/00003086-200212000-00003>.
- Hill, Amanda Baracho Trindade, Fabiana Fernandes Bressan, Bruce D. Murphy, and Joaquim Mansano Garcia. “Applications of Mesenchymal Stem Cell Technology in Bovine Species.” *Stem Cell Research & Therapy* 10, no. 1 (December 24, 2019): 44. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1145-9>.
- Hmadcha, Abdelkrim, Alejandro Martin-Montalvo, Benoit R. Gauthier, Bernat Soria, and Vivian Capilla-Gonzalez. “Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (February 5, 2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>.
- J. Braga Osorio Gomes Salgado, Antonio, Rui L. Goncalves Reis, Nuno Jorge Carvalho Sousa, Jeffrey M. Gimble, Antonio J. Salgado, Rui L. Reis, and Nuno Sousa. “Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine.” *Current Stem Cell Research & Therapy* 5, no. 2 (June 1, 2010): 103–10. <https://doi.org/10.2174/157488810791268564>.

Jervis M, Huaman O, Cahuascanco B, Bahamonde J, Cortez J, Arias JI, et al.. Comparative analysis of in vitro proliferative, migratory and pro-angiogenic potentials of bovine fetal mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Vet Res Commun.* (2019) 43:165–78. 10.1007/s11259-019-09757-9

João P. Cotovio, Tiago G. Fernandes, Maria Margarida Diogo, Joaquim M.S. Cabral, Chapter 1 - Pluripotent stem cell biology and engineering. *Engineering Strategies for Regenerative Medicine*, Academic Press, 2020, Pages 1-31, ISBN 9780128162217, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816221-7.00001-X>.

Jullien, M. y J. M. Thiollay. 1996. Effects of rainforest disturbance and fragmentation: comparative changes of the raptor community along natural and human–made gradients in French Guiana. *Journal of Biogeography* 23:7–25.

Kern, Susanne, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Klüter, and Karen Bieback. “Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue.” *STEM CELLS* 24, no. 5 (May 2, 2006): 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>.

Khatri M, Sharma JM. Susceptibility of chicken mesenchymal stem cells to infectious bursal disease virus. *J Virol Methods.* 2009 Sep;160(1-2):197-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.05.008. Epub 2009 May 15. PMID: 19447145.

Kozłowska U, Krawczyński A, Futoma K, Jurek T, Rorat M, Patrzalek D, Klimczak A. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J Stem Cells.* 2019 Jun 26;11(6):347-374. doi: 10.4252/wjsc.v11.i6.347. PMID: 31293717; PMCID: PMC6600850.

Kurenkova Anastasiia D., Medvedeva Ekaterina V., Newton Phillip T., Chagin Andrei S. Niches for Skeletal Stem Cells of Mesenchymal Origin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, volume 8, 2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00592>. doi: 10.3389/fcell.2020.00592. ISSN:2296-634X

- Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.J., Coulomb B., Desmouliere A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol. Biol.* 2014;62:108–117. doi: 10.1016/j.patbio.2014.01.002.
- Le, Hanxiang, Weiguo Xu, Xiuli Zhuang, Fei Chang, Yinan Wang, and Jianxun Ding. “Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Regeneration.” *Journal of Tissue Engineering* 11 (January 2020): 204173142094383. <https://doi.org/10.1177/2041731420943839>.
- Le, Quang, Vedavathi Madhu, Joseph M Hart, Charles R Farber, Eli R Zunder, Abhijit S Dighe, and Quanjun Cui. “Current Evidence on Potential of Adipose Derived Stem Cells to Enhance Bone Regeneration and Future Projection.” *World Journal of Stem Cells* 13, no. 9 (September 26, 2021): 1248–77. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i9.1248>.
- Li et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue under Xeno-Free Conditions for Cell Therapy. *Stem Cell Research & Therapy*. Volume 6, page 55. ISSN: 1757-6512. doi:10.1186/s13287-015-0066-5.
- Loh, K. M. & Lim, B. A Precarious Balance: Pluripotency Factors as Lineage Specifiers. *Cell Stem Cell* 8, 363–369 (2011).
- McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):483-95. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00075-9. PMID: 15068789.
- Minteer, Danielle, Kacey G. Marra, and J. Peter Rubin. “Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications,” 59–71, 2012. https://doi.org/10.1007/10_2012_146.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, Abdollah, Abbas Shafiee, Ehsan Seyedjafari, Peyman Dinarvand, Abdolkakim Toghdroy, Iman Bagherizadeh, Karl Schellander, Mehmet Ulas Cinar, and Masoud Soleimani. “Isolation, Characterization, and Mesodermic Differentiation of Stem Cells from Adipose Tissue of Camel (*Camelus Dromedarius*).” *In Vitro Cellular &*

Developmental Biology - Animal 49, no. 2 (February 9, 2013): 147–54.
<https://doi.org/10.1007/s11626-012-9578-9>.

Noronha, Nádia de Cássia, Amanda Mizukami, Carolina Caliári-Oliveira, Juçara Gastaldi Cominal, José Lucas M. Rocha, Dimas Tadeu Covas, Kamilla Swiech, and Kelen C. R. Malmegrim. “Priming Approaches to Improve the Efficacy of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies.” *Stem Cell Research & Therapy* 10, no. 1 (December 2, 2019): 131.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>.

Oh, Min, and Jacques E. Nör. “The Perivascular Niche and Self-Renewal of Stem Cells.” *Frontiers in Physiology* 6 (December 2, 2015).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00367>.

Oyarzo, Rudy, Ximena Valderrama, Francisca Valenzuela, and Javiera Bahamonde. “Bovine Fetal Mesenchymal Stem Cells Obtained From Omental Adipose Tissue and Placenta Are More Resistant to Cryoprotectant Exposure Than Those From Bone Marrow.” *Frontiers in Veterinary Science* 8 (October 4, 2021).
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.708972>.

Palma, Gustavo A. *Biología de la Reproducción*. (2001).

Pittenger, Mark F., Dennis E. Discher, Bruno M. Péault, Donald G. Phinney, Joshua M. Hare, and Arnold I. Caplan. “Mesenchymal Stem Cell Perspective: Cell Biology to Clinical Progress.” *Npj Regenerative Medicine* 4, no. 1 (December 2, 2019): 22.
<https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.

R. Dirzo, P.H. Raven. Global state of biodiversity and loss. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, 28 (2003), pp. 137-167

Richard L. Gardner, Chapter 1 - Pluripotential Stem Cells from Vertebrate Embryos: Present Perspective and Future Challenges, Editor(s): Robert Lanza, John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, E. Donnall Thomas, James Thomson, Ian

Wilmut, Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition), Academic Press, 2009, Pages 1-11, ISBN 9780123747297, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374729-7.00001-9>.

Saeedi, Pardis, Raheleh Halabian, and Abbas Ali Imani Fooladi. “A Revealing Review of Mesenchymal Stem Cells Therapy, Clinical Perspectives and Modification Strategies.” *Stem Cell Investigation* 6 (September 2019): 34–34. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.08.11>.

Sampaio RV, Chiaratti MR, Santos DCN, Bressan FF, Sangalli JR, Sá ALA, Silva TV, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SS, Ambrosio CE. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality. *Genet Mol Res.* 2015;14(1):53–62.

Santoro A, McGraw TE, Kahn BB. Insulin action in adipocytes, adipose remodeling, and systemic effects. *Cell Metab.* 2021 Apr 6;33(4):748-757. doi: 10.1016/j.cmet.2021.03.019. PMID: 33826917; PMCID: PMC8078167.

Sergio, F., T. Caro, D. Brown, B. Clucas, J. Hunter, J. Ketchum, K. McHugh y F. Hiraldo. 2008. Top predators as conservation tools: ecological rationale, assumptions, and efficacy. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 39:1–19.

Shahriyari L, Komarova NL. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLoS One.* 2013 Oct 29;8(10):e76195. doi: 10.1371/journal.pone.0076195. PMID: 24204602; PMCID: PMC3812169.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells* 4, 7–25.

Silva CG, Martins CF, Cunha ER, Bessler HC, Cardoso T, Martins GHL, Bão SN. Isolation, characterization and differentiation of bovine derived mesenchymal stem cells from amniotic fluid, Wharton’s jelly and adipose tissue. *Anim Reprod.* 2014;11(3):476.

Slotkin, Theodore A., and Frederic J. Seidler. "Antimitotic and Cytotoxic Effects of Theophylline in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 64, no. 3 (December 2000): 259–67. <https://doi.org/10.1023/A:1026508605951>.

Svetlana Gavrilov, Donald W. Landry, Chapter 25 - Ethics in Regenerative Medicine, Editor(s): Michael S. Goligorsky, Regenerative Nephrology, Academic Press, 2011, Pages 401-408, ISBN 9780123809285, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380928-5.10025-9>

Svoradova, Andrea, Vladimir Zmrhal, Eva Venusova, and Petr Slama. "Chicken Mesenchymal Stem Cells and Their Applications: A Mini Review." *Animals* 11, no. 7 (June 24, 2021): 1883. <https://doi.org/10.3390/ani11071883>.

Svoradová, Jaromír Vašíček, Vladimír Zmrhal, Eva Venusová, Aleš Pavlík, Miroslav Bauer, Lucia Olexiková, Vladimír Langraf, Petr Sláma, Peter Chrenek. Mesenchymal stem cells of Oravka chicken breed: promising path to biodiversity conservation. *Poultry Science*, Volume 102, Issue 8, 2023, 102807, ISSN 0032-5791, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102807>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579123003267>)

Waddington CH. *The Strategy of the Genes*. London, UK: Volume George Allen and Unwin; 1957.

Wang X, C FH, Wang JJ, Ji H, Guan W, Zhao Y. Isolation, culture, and characterization of chicken lung-derived mesenchymal stem cells. *Can J Vet Res*. 2018 Jul;82(3):225-235. PMID: 30026648; PMCID: PMC6040015.

Wang, Qi, Abdul Haseeb, Xiangfei Meng, Yongchao Feng, Abid Hussain, and Ping Yang. "Telocytes in the Esophageal Wall of Chickens: A Tale of Subepithelial Telocytes." *Poultry Science* 101, no. 7 (July 2022): 101859. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101859>.

Weissman, Irving L., David J. Anderson, and Fred Gage. "Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, no. 1 (November 2001): 387–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387>.

Zakrzewski, Wojciech, Maciej Dobrzyński, Maria Szymonowicz, and Zbigniew Rybak. "Stem Cells: Past, Present, and Future." *Stem Cell Research & Therapy* 10, no. 1 (December 26, 2019): 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.