



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**ESTUDIO *IN VITRO* SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS
MESENQUIMALES DE BOVINO HACIA LOS LINAJES MUSCULAR Y
ADIPOSO, ASÍ COMO SU EFECTO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JESÚS JONATHAN RAMÍREZ ESPINOSA

TUTOR

DRA. MARÍA OFELIA MORA IZAGUIRRE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI , ESTADO DE MÉXICO

OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mis padres por apoyarme siempre en todo lo que he hecho sin cuestionarme.

Amá, Apá los amo.

A la familia en todas sus extensiones, hermanas, tíos, primos, que con sus palabras de aliento me motivan a seguir adelante.

A los que ya no están pero siguen presentes.

A la familia de destino, los amigos cercanos y lejanos, temporales o definitivos, a las buenas y malas influencias que te enseñan un poco más a vivir y disfrutar la vida.

Agradecimientos.

A la Doctora Ofelia Mora por aceptarme como su estudiante y brindarme todo el apoyo y los regaños necesarios para culminar este trabajo. Ahora ya tengo una mamá académica.

A los Doctores Armando Shimada y Enrique Piña por sus observaciones a lo largo de este trayecto, por sus consejos más allá de lo académico, pero sobre todo por sus humildad como seres humanos.

A Laura González, MC Técnico académico del RuMen por todas sus enseñanzas, apoyarme en la realización de este proyecto y por su amistad.

Al laboratorio de diferenciación neuronal y axogénesis (A-03) del Instituto de Neurobiología encabezado por el Dr. Alfredo Varela, por el apoyo brindado, tanto material como intelectual, para la realización de esta tesis.

A los compañeros y amigos que vivieron conmigo esta etapa. La mejor de las suertes para todos ellos.

A los miembros del jurado, Dra. Aurea Orozco, Dr Miguel Ángel Cornejo, Dr. Carlos Gutiérrez y MC Pablo Pérez-Gavilán por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo, así como por sus observaciones y aportaciones al mismo.

A mi *alma mater*, la UNAM que me ha nutrido más de la mitad de mi vida y particularmente a la FES Cuautitlán por las enseñanzas adquiridas en ella, las oportunidades que me ha dado.

A CONACyT por la beca otorgada y tener así el apoyo financiero para realizar mis estudios.

“Los dos llegaron cojeando: Guy y el perrito más dócil que había nacido en el patio. Guy tenía una pierna vendada y el perrito una de las patitas envuelta en trapos. Los dos caminaban a saltos. El perrito gruñía – tal vez de dolor – y meneaba la cola – tal vez de agradecimiento.

- Nos caímos Jacinto.

- Ya lo veo, niño Guy.

- Al perrito se le torció una patita. Ya se la compuse.

- ¿Y tú?

- Acércate. No se lo digas a nadie. Yo no tengo nada. Me vendé sólo para consolarlo

CANEK

ERMILO ABREU GÓMEZ

INDICE

	Página
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INDICE DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	15
Artículo. Células troncales mesenquimales: biología, caracterización y futuras aplicaciones en salud y producción de especies pecuarias. Parte I. Rosa M. Pérez-Serrano, Jesús J. Ramírez-Espinosa, Armando Shimada, Anaid Antaramian, Enrique Piña, Ofelia Mora	15
Artículo. Células troncales mesenquimales: biología, caracterización y futuras aplicaciones en salud y producción de especies domésticas y pecuarias. Parte II. Rosa M. Pérez-Serrano, Jesús J. Ramírez-Espinosa, Armando Shimada, Anaid Antaramian, Enrique Piña, Ofelia Mora.	15
Células troncales mesenquimales: biología, caracterización y futuras aplicaciones en salud y producción de especies pecuarias. Parte I.	16
Resumen	16
Introducción	16
Biología	17
Caracterización	19
Capacidad de adhesión al plástico	19
Capacidad proliferativa	19
Detección de proteínas de superficie	20
Expresión de factores de transcripción	22
Multipotencialidad	23
Conclusiones	25
Literatura Citada	25

Artículo. Células troncales mesenquimales: biología, caracterización y futuras aplicaciones en salud y producción de especies domésticas y pecuarias. Parte II.	28
Resumen	28
Introducción	28
Caracterización de células troncales mesenquimales de especies domésticas	29
Caninos	29
Felinos	29
Equinos	30
Porcinos	30
Ovinos y caprinos	31
Bovinos	31
Aves	32
Aplicaciones de las CTM de MO en medicina veterinaria y zootecnia	33
Terapéutica	33
Producción pecuaria	34
Desarrollo y metabolismo de músculo y tejido adiposo	34
Reproducción, transferencia nuclear, tecnologías de ADN recombinante y transgénicos.	35
Producción de carne in vitro	36
Conclusiones	37
Literatura citada	37
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo General	42
3. 2Objetivos específicos	42
4 MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.	43
Artículo. Bovine (<i>Bos taurus</i>) bone marrow mesenchymal cells differentiation to adipogenic and myogenic lineages. Jesús Jonathan	43

Ramírez-Espinosa, Laura González-Dávalos, Armando Shimada, Enrique Piña, Alfredo Varela-Echavarría, y Ofelia Mora.

Abstract	47
Abbreviations used in this paper	48
Introduction	49
Material and methods	50
Cell isolation, culture, and passaging.	50
RNA Isolation	51
cDNA synthesis	51
Real time-PCR	52
Experiment 1: Proliferation capacity, mesenchymal stem cell marker assessment, and induction of adipogenic and myogenic lineages.	53
Proliferation capacity	53
Expression of MSC markers	54
Adipogenic differentiation	54
Myogenic differentiation	55
Experiment 2: Enhancement of adipogenic and myogenic differentiation of bovine bone marrow-derived MSC and changes in expression of genes related to energy metabolism.	56
Adipogenic differentiation	56
Myogenic differentiation	56
Statistical analysis	57
Results	58
Experiment 1	58
Proliferation capacity	58
Expression of MSC markers	58
Adipogenic differentiation	58
Myogenic differentiation	59
Experiment 2	60
Effect of PPAR agonists on adipogenic differentiation	60

Effect of PPAR agonists on myogenic differentiation	61
Discussion	62
Differentiation improvement	65
Effect on adipogenesis	65
Effect on myogenesis	67
Effects of PPAR agonists on energy metabolism	69
Conclusions	71
Acknowledgements	72
References	72
Figure legends	80
Tables	83
Figures	88
5. DISCUSIÓN	93
6. CONCLUSIONES	106
7. LITERATURA CITADA	107

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales (CTM) son células multipotenciales capaces de diferenciarse a varios linajes, esto las hace un modelo útil para estudiar el desarrollo y la diferenciación. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes agonistas de los PPAR sobre la diferenciación y metabolismo de CTM derivadas de bovino e inducidas a los linajes muscular y adiposo. Se aislaron células de médula ósea de becerros Holstein de 7 días de edad y se evaluaron las condiciones para promover la diferenciación adiposa (DA) y muscular (DM). Para la DA se usaron células del primer pasaje y se suplementó el medio con Rosiglitazona, Telmisartan, Sirtinol o Ácido Linoleico conjugado 9-cis, 11-trans. Para la DM se agregó al medio Bezafibrato, Telmisartan o Sirtinol. Mediante qPCR se evaluó la expresión de PPAR γ para la DA y de cadena pesada de miosina (MyHC) para la DM así como genes relacionados con el metabolismo energético. Los datos obtenidos se analizaron como un modelo completamente aleatorizado usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS. Para la DA, el uso de Telmisartan a 20 μ M mostró la mayor expresión de PPAR γ (15.58 ± 0.62 , $p < 0.0001$) y se encontraron diferencias en la expresión de Hexocinasa II (HK2) ($p < 0.0001$); Fosfofructocinasa (PFK) ($p = 0.0027$); Lipasa de Triglicéridos del Adipocito (ATGL) ($p < 0.0001$); Acetil-CoA carboxilasa α (ACAC α) ($p < 0.0001$) y Ácido Graso Sintasa (FASN) ($p < 0.0001$), pero no para ACAC β ($p = 0.4275$). Para la DM, el Bezafibrato a 200 μ M mostró la mayor expresión de MyHC (73.98 ± 11.79), y se encontraron diferencias en la expresión para todos los genes evaluados (HK2: $p = 0.0011$; PFK: $p = 0.0328$; ACAC β : $p < 0.0001$; PPAR δ $p = 0.0097$; y FABP: $p < 0.0001$). Estos resultados indican que se incrementa la diferenciación hacia adipocitos y miocitos en células de bovino derivadas de médula ósea con el uso de Telmisartan y Bezafibrato respectivamente, además de que la captación, almacenamiento, uso y movilización de sustratos energéticos se mejora con ambos compuestos.

Palabras clave: PPAR, diferenciación celular, metabolismo de energía

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells able to differentiate into several lineages, making them a useful model to study development and differentiation. The purpose of this study was to evaluate the effect of PPAR agonists on differentiation and metabolic features of bovine MSC induced to adipogenic or myogenic lineages. Bone marrow cells from 7 days old Holstein calves were isolated and conditions to promote adipogenic differentiation (AD) or myogenic differentiation (MD) were explored. For AD, cultured cells after one passage, were transferred to adipogenic medium supplemented with either Rosiglitazone, Telmisartan, Sirtinol, or Conjugated 9-*cis*, 11-*trans* linoleic acid. For MD, third-passage cells were added to myogenic medium with either Bezafibrate, Telmisartan, or Sirtinol. mRNA expression of PPAR γ for AD, myosin heavy chain (MyHC) for MD, and genes related to energy metabolism were measured by qPCR. Data were analyzed as a completely randomized design using the GLM procedure from SAS. For AD 20 μ M Telmisartan showed the highest PPAR γ expression (15.58 ± 0.62 fold, $p < 0.0001$) and differences in expression of energy metabolism related genes were found for Hexokinase II (HK2) ($p < 0.0001$); Phosphofructokinase (PFK) ($p = 0.0027$); Adipose triglyceride lipase (ATGL) ($p < 0.0001$); Acetyl-CoA carboxylase α (ACAC α) ($p < 0.0001$) and Fatty acid synthase (FASN) ($p < 0.0001$), but not for ACAC β ($p = 0.4275$). For MD, 200 μ M Bezafibrate showed the highest MyHC expression (73.98 ± 11.79 fold), and differences in the expression of all energy metabolism related genes were found (HK2: $p = 0.0011$; PFK: $p = 0.0328$; ACAC β : $p < 0.0001$; PPAR δ $p = 0.0097$; and FABP: $p < 0.0001$). This results point out that adipocyte and myocyte differentiation of bovine-derived MSC is enhanced with Telmisartan and Bezafibrate, respectively; energy uptake, storage, mobilization, and use of energy substrates are improved with both compounds.

Keywords: PPAR, cell differentiation, energy metabolism

INDICE DE ABREVIATURAS

ACACa / b	Acetil Coenzima A carboxilasa a / b
ADM	Medio de diferenciación adiposa
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARN / RNA	Ácido ribonucleico
ATGL	Lipasa de triglicéridos del adipocito / Desnutrina
BM	Medio basal
BMD-MSC	Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea
BMP4	Proteína morfogenética 4
C/EBPα / β	Proteínas de unión al promotor CCAAT α / β
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CH / HC	Células hematopoyéticas
CLA 9Z, 11E	Ácido linoleico conjugado 9 cis, 11 trans
CPT-1	Carnitin palmitoil transferasa 1
CT / SC	Células troncales
CTE / ESC	Células troncales embrionarias
CTM / MSC	Células troncales mesenquimales
CTS / SSC	Células troncales somáticas
DA / AD	Diferenciación adiposa
DM / MD	Diferenciación muscular
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EF1α	Factor de elongación 1- α
Eya1	Homólogo de la proteína ojos ausentes
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FASN	Ácido graso Sintasa
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GAPDH	Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa

Gasp 1	Factor de crecimiento y diferenciación asociado a la proteína sérica-1
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HK2	Hexocinasa II
HS	Suero equino
IBMX	Isobutil-metil xantina
ICQ	Inmunocitoquímica
IL-11	Interleucina 11
IL-6	Interleucina 6
IM	Medio de inducción para diferenciación adiposa
I-MET	Inmunomicroscopía electrónica
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
ITS	Suplemento de insulina, transferrina, selenito de sodio
LPL	Lipoproteína lipasa
MCC	Microscopía de campo claro
MEF2C	Factor potenciador específico de miocitos 2C
Meox1	Proteína de la homeobox MOX-1
MET	Microscopía electrónica
MO / BM	Médula ósea
MRF4	Factor regulador del músculo 4, Factor miogénico 6, Herculina
Myf5	Factor miogénico 5
MyHC	Cadena pesada de miosina
MyoD1	Proteína de determinación de mioblastos 1
Pax3	Factor de transcripción Paired box 3
Pax7	Factor de transcripción Paired box 7
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PD	Duplicaciones celulares
PFK	Fosfofructocinasa

PPAR α / γ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas α / γ
PPIA	Ciclofilina A
PPRE	Elemento de respuesta a PPARs
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
RPL13a	Proteína ribosomal L13a
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa tras transcripción reversa
Six1	Proteína de la homeobox SIX-1
TGF-β1 / β3	Factor de crecimiento transformante β 1 y β 3
WB	Western blot
YWHAZ	Proteína de activación de la Tirosin-3-monooxigenasa y Triptófano-5-monooxigenasa

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento del sector pecuario, impulsado por la industrialización de la producción y el incremento de la demanda de los productos de origen animal, exige una mejora en la capacidad de producción y en la calidad de los productos ofertados a los consumidores. Por lo que, en el caso de los productos cárnicos, es necesario el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que regulan tanto el metabolismo energético como los procesos de diferenciación y desarrollo de los tejidos muscular y adiposo. A la par del entendimiento de estos procesos se requiere el desarrollo de nuevas tecnologías con el fin de incrementar la eficiencia de las diferentes especies pecuarias. Dentro de estas nuevas tecnologías, se encuentra el uso potencial de moléculas sintéticas o naturales, que, mediante la regulación de la expresión génica, modifiquen positivamente el metabolismo y diferenciación de los tejidos muscular y adiposo. En este sentido los Receptores Activados por Proliferador de Peroxisomas (PPARs) son blancos potenciales de estas tecnologías al ser factores de transcripción relacionados con la regulación del metabolismo energético y con la diferenciación celular. Por otro lado las células troncales mesenquimales (CTM) son células multipotenciales capaces de dar origen a diversos tejidos (adiposo, óseo, muscular, neuronal, entre otros). Esta propiedad de las CTM las hacen un modelo atractivo para el estudio de los mecanismos implicados en la diferenciación celular por lo que en el presente trabajo se les utilizó como modelo biológico para evaluar el efecto de diferentes compuestos que modificaran la actividad de los PPARs y con ello la capacidad de diferenciación y el metabolismo energético de estas células ya diferenciadas hacia los linajes muscular y adiposo.

2. ANTECEDENTES

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: BIOLOGÍA, CARACTERIZACIÓN Y FUTURAS APLICACIONES EN SALUD Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES PECUARIAS. PARTE I

Rosa M. **Pérez-Serrano**, Jesús J. **Ramírez-Espinosa**, Armando **Shimada**,
Anaid **Antaramian**, Enrique **Piña**, Ofelia **Mora**

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: BIOLOGÍA, CARACTERIZACIÓN Y FUTURAS APLICACIONES EN SALUD Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES DOMÉSTICAS Y PECUARIAS. PARTE II

Rosa M. **Pérez-Serrano**, Jesús J. **Ramírez-Espinosa**, Armando **Shimada**,
Anaid **Antaramian**, Enrique **Piña**, Ofelia **Mora**

Artículos publicados en: *Agrociencia*, Vol. 46, No 4 y 6 respectivamente.

CÉLULAS TRONCALES MESENCQUIMALES: BIOLOGÍA, CARACTERIZACIÓN Y FUTURAS APLICACIONES EN SALUD Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES PECUARIAS. PARTE I

MESENCHYMAL STEM CELLS: BIOLOGY, CHARACTERIZATION AND FUTURE APPLICATIONS TO ANIMAL HEALTH AND LIVESTOCK PRODUCTION. PART I

Rosa M. Pérez-Sotomayor¹, Jessi J. Ramírez-Espinoza¹, Armando Shimada²,
David Arzamendi³, Diego Páez⁴, Ofelia Mosa⁵

Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México; Facultad de Biología y Medicina de la Universidad del Bajío (UBJ), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Blvd. Juriquilla 333, Querétaro, estado de Querétaro, 76230, México; *1*Centro de Investigación en Neurobiología, UNAM, Blvd. Juriquilla 300, Querétaro, estado de Querétaro, 76230, México; *2*Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Av. 201, Ciudad de México, 04510, México

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales poseen características que las convierten en un modelo único para la investigación en el área biomédica. Se emplean como herramienta biotecnológica para solucionar innovadores problemas de salud en humanos y animales. Estas células se caracterizan por una alta capacidad proliferativa, siendo viables por periodos prolongados y por su multipotencialidad al diferenciarse a diversos linajes celulares, incluyendo su uso en salud para la regeneración y reparación de tejidos, transgénico de células madre y manipulación de la diferenciación celular, a lo cual se le denomina terapia celular. El presente trabajo aborda sus aspectos básicos de su biología y caracterización en las especies domésticas enfatizando la necesidad de homogeneizar los criterios que permitirán reconocer estas células en las especies pecuarias y sus posibles aplicaciones en salud y producción pecuaria.

Palabras clave: células troncales mesenquimales, células que autorrenovación, diferenciación, células que reparan tejidos, multipotencialidad.

INTRODUCCIÓN

A partir del año 2000 el estudio de las células troncales tomó auge debido a sus diferentes aplicaciones biológicas, convirtiéndose en un modelo para estudiar la biología molecular, celular y

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells have characteristics that make them a unique model for research in the biomedical area. In use as a biotechnological tool allows for innovative solutions for health problems in humans and animals. These cells are characterized by a high proliferative capacity of being viable for long periods and for their multipotency capacity to differentiate into a wide variety of cell lineages having in it their value for tissue engineering and repair, treatment of diseases and manipulation of cell differentiation and stem animal production. This paper covers basic aspects of their biology and characterization in domestic species emphasizing the need to homogenize the criteria that would allow to characterize these cells in the livestock species and their possible applications in health and livestock production.

Key words: mesenchymal stem cells, stem cells, tissue differentiation, cell differentiation, tissue repair, cells potentiality.

INTRODUCTION

Since 2000, the study of stem cells became widely considered due to their different biological applications, becoming a model for studying molecular biology, cellular and organogenesis processes. A better understanding of their characteristics will have the manipulation of cell differentiation in order to solve various problems in many areas, and here animal husbandry and veterinary clinical applications.

¹Autores responsables de la carta de correspondencia.
Recibido: Septiembre 15, 2011; Aprobado: mayo 2012.
Publicado como ENSACU en Agrociencia 46: 371-382, 2012.

los procesos de organogénesis. El mejor conocimiento de sus características favorecerá la manipulación de la diferenciación celular con el objetivo de resolver diversas problemáticas en múltiples áreas, y aquí se enfoca la clínica veterinaria y la zootecnia.

Biología

Las células madre (CM) presentan la capacidad de pluripotencialidad o multipotencialidad al diferenciarse a linajes celulares diversos y proliferar en forma indefinida (Bianchi de D'Adda, 2006; Lindner *et al.*, 2010), por lo tanto las CM se clasifican en embrionarias (CE) y somáticas (CS). Las CE derivan de la masa celular interna del blastocisto, y a partir de ellas se originan las capas germinales en el embrión, por lo que se consideran células pluripotenciales capaces de diferenciarse hacia cualquier linaje celular en el organismo (Jiang *et al.*, 2007). Las CS son células multipotenciales (con capacidad de diferenciación hacia un o algunos linajes celulares) provenientes de diversos tejidos y que, por su capacidad de autorenewación, pueden ser cultivadas por largos periodos (Carroll *et al.*, 2010).

Las CS se han aislado de ratón, rat, perro, mono, cerdo, oveja, vaca, conejo, gato, pollo (Kharai *et al.*, 2009) y humano (Loebly *et al.*, 2003) y de diferentes tejidos: médula ósea (MO), tejido adiposo (Fraser *et al.*, 2006), cordón umbilical (Mencos *et al.*, 2005), músculo (Jiang *et al.*, 2007), placenta, sangre periférica (He *et al.*, 2007), músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, tejido pulmonar (Azeite *et al.*, 2007), hígado fetal (Saragusa *et al.*, 2009) riñón y páncreas (da Silva *et al.*, 2006), siendo los ratones y vacas los ejes de estudio más frecuentes. La utilización de CM de tejidos específicos en aplicaciones como la terapia celular tiene como restricciones el tipo de aislamiento, la involucración de la técnica y la cantidad y plasticidad de las células aisladas. La plasticidad de las CM se refiere de manera adulta a su capacidad de autorrenovación, orientándose a la capacidad de diferenciación hacia los linajes celulares de los tejidos donde residen. Se ha mostrado que, *in vitro*, las células con propiedades pueden ser reprogramadas y diferenciarse a más de un tipo celular (Hildebrand *et al.*, 2007). La médula ósea es donde poseen su mayor capacidad, conservando la plasticidad que les caracteriza.

La metodología para obtener CM desde la MO, estandarizada en la década de 1990, consiste en la

Biología

stem cells (SC) have the pluripotent or multipotent capacity to differentiate into various cell lineages and proliferate in an undifferentiated form (Bianchi de D'Adda, 2006; Lindner *et al.*, 2010); for their origin SC are classified in embryonic (ESC) and somatic (SSC) cells. The ESCs derive from the inner cell mass of blastocysts, and from them the germinal layers are originated in the embryo, so they are considered pluripotent cells capable to differentiate from any cell lineage in the organism (Jiang *et al.*, 2007). The SSCs are multipotent cells (with capacity of differentiation limited to some cell lineages) from various tissues and that, for their self-renewal capacity, can be cultivated for long periods (Carroll *et al.*, 2010).

The SSCs have been isolated from mouse, rat, dog, monkey, pig, sheep, goat, rabbit, cow, chicken (Kharai *et al.*, 2009), and human beings (Loebly *et al.*, 2003) and from different tissues: bone marrow (BM), adipose tissue (Fraser *et al.*, 2006), umbilical cord (Mencos *et al.*, 2005), muscle (Jiang *et al.*, 2007), placenta, peripheral blood (He *et al.*, 2007), skeletal muscle, dermis, synovium, lung tissue (Azeite *et al.*, 2007), fetal liver (Saragusa *et al.*, 2009), kidney and pancreas (da Silva *et al.*, 2006), being the first three tissues the most frequently used for the isolation. The use of SSCs from specific tissues in applications such as cell therapy has as restrictions the success of the isolation, the involvement of the technique, and the amount and plasticity of the isolated cells. The plasticity of the SSCs in case of adult animals is limited, orienting the differentiation capacity into the cell lineages of the tissues where they reside. It has been shown that, *in vitro*, isolated cells can be reprogrammed and differentiated to more than one cell type (Hildebrand *et al.*, 2007). The bone marrow is where they have the involvement, retaining their characteristic plasticity.

The methodology to obtain SSCs from the BM, standardized in the 1990s, consists in the BM aspirate from the iliac crest or femoral epiphysis and selection of cells by density gradients. The BM is a semi-solid tissue located in the medullar cavity of long bones, sternum, hip bones and vertebral body; consists of endothelial, stromal cells, adipocytes, macrophages, fibroblastic cells, serogenic progenitor cells, and senescent stem cells (Majumdar *et al.*, 1998). The main function of BM is to provide and maintain SSCs in

regulación de la MO de la epinefina o la epifisi lateral y la absorción de calcio mediante gradientes de densidad. La MO es un tejido sinusal localizada en la cavidad medular de los huesos largos, esternón, huesos de la cadera y vertebrae espinales; está compuesta por células endoteliales, eritrocitos, adipocitos, macrófagos, fibroblastos, células precursoras osteogénicas y células troncales somáticas (Majumdar *et al.*, 1998). La función principal de la MO es proveer y sostener CTS para reparar el tejido dañado en el organismo, por lo cual se trata con mayores reservas (Nauta *et al.*, 2004).

Las CTS de MO se dividen en dos grupos: células hematopoyéticas (CH) y CT mesenquimales (CTM). Las CH presentan multipotencialidad hacia eritrocitos, monocitos, granulitos, mastocitos, linfocitos y megacariocitos (Bianchi de D. Roio, 2004; Hombach-Klonisch *et al.*, 2008), constituyen solo una pequeña porción de las células nucleadas de los tejidos, aproximadamente una célula por cada 10^4 a 10^5 células, y pueden aislarse de MO, sangre periférica y sangre del cordón umbilical (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008).

Las CTM presenta multipotencialidad hacia tejidos conjuntivos como hueso (Dong *et al.*, 2009), cartilago (Vidal *et al.*, 2006), adiposa, muscular (Zeng *et al.*, 2006), y neuronal entre otros, sostenidamente proliferativas lo que permite mantener cultivos celulares durante largos periodos. Los cultivos *in vitro* consisten de una población heterogénea (Bianchi *et al.*, 2004) y morfológicamente presentan forma alargada (denominada fibroblasto), con un núcleo grande, alargado y difuso con dos o tres nucleolos (Florez-Figueroa *et al.*, 2005). En la figura 1 se muestran las morfologías de las CTS de cuatro especies pecunias obtenidas a partir de médula ósea y cordón, mostrando diferencias en el tamaño, forma y organización en el cultivo *in vitro*; sin embargo, coexisten las características morfológicas antes descritas.

Las funciones endógenas de las CTM en la reparación de tejidos son poco claras. Sin embargo, se ha demostrado que aumentan la proliferación y sostienen la vasculogénesis mediante la secreción de citocinas y factores de crecimiento (interleucina 6 (IL-6), IL-1), factor inhibidor de leucemia y factor de estimación de colonias de monocitos y granulocitos) que permiten la regeneración de tejido dañado (Guan *et al.*, 2003).

reparar tejidos dañados en el cuerpo, making it the site with the largest reserves (Nauta *et al.*, 2004).

The SSCs of BM are classified into two groups: hematopoietic (HC) and mesenchymal SC cells (MSCs). The HCs have multipotentiality to erythrocytes, macrophages, granulocytes, lymphocytes, and megakaryocyte (Bianchi de D. Roio, 2004; Hombach-Klonisch *et al.*, 2008); they represent only a small portion of nucleated sorted cells, approximately one cell per 10^4 to 10^5 cells, and can be isolated from BM, peripheral blood, and umbilical cord blood (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008).

MSCs have multipotentiality to repair tissues such as bone (Dong *et al.*, 2009), cartilage (Vidal *et al.*, 2006), adipose, muscle (Zeng *et al.*, 2006), and neuronal among others; they are highly proliferative, allowing cell cultures to be maintained for long periods. *In vitro* cultures consist of a heterogeneous population (Bianchi *et al.*, 2004) and, morphologically, they have a slender shape (referred to as fibroblast), with a large, diffuse, and central nucleus with two or three nucleoli (Florez-Figueroa *et al.*, 2006). Figure 1 shows the morphology of the SSCs of four human species obtained from bone marrow and cord, showing differences in size, shape, and organization in the *in vitro* cultures; however, they retain the morphological characteristics described above.

The endogenous functions of the MSCs in tissue repair are unclear. However, it has been determined that they increase proliferation and they control vasculogenesis by secreting cytokines and growth factors (interleukin 6 (IL-6), IL-1), leukemia inhibitory factor, and stimulating factor of colonies of macrophages and granulocytes) which allow the regeneration of damaged tissue (Guan *et al.*, 2003).

Characterization

Dominko *et al.* (2006), on behalf of the International Society for Cellular Therapy (ISCT), indicate five basic criteria to identify cell population as MSC:

Ability of adherence to plastic

MSCs have the ability of adherence to plastic (Arcealy *et al.*, 2007; Bianco *et al.*, 2001), allowing

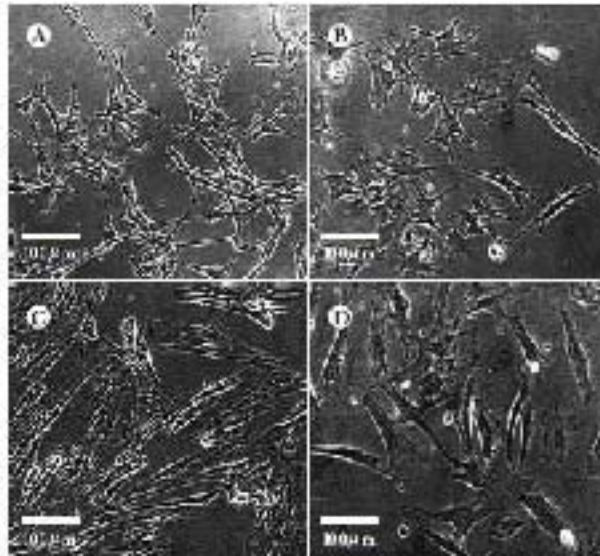


Figure 1. Morphology of the cultured mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from sheep bone marrow (A), chicken bone marrow (B), pig skin (C) and bovine (D). (Micrographs composite, zoomed 30x).

Figure 1. Morphology of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from sheep marrow (A), chicken bone marrow (B), pig (C) and bovine (D). (Bright field microscope, 100x magnification).

Caracterización

Dominici *et al.* (2006), a nombre de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), establecieron criterios básicos para identificar una población celular como CTM.

Capacidad de adherencia al plástico

Las CTM presentan la habilidad de adherencia al plástico (Arriola *et al.*, 2007; Planas *et al.*, 2001) lo cual permite seleccionarlas de la población heterogénea de la que son aisladas (incluyendo las CH y células reñolares) y que carecen de esta propiedad (Chamberlain *et al.*, 2007).

Capacidad proliferativa

Las CTM pueden cultivarse *in vitro* por períodos prolongados en estado indiferenciado y alcanzar un período de vida de entre 75 y 90 divisiones celulares (Grove *et al.*, 2004), por lo cual sólo pueden mantenerse *in vitro* un número limitado de subcultivos. Después ocurre una reducción progresiva de la proliferación, por lo que se los denomina Líneas Celulares Finitas (Friedberg, 2006). Esta reducción en las CTM

their selection from the heterogeneous population of which they are isolated (including FC and stromal cells) that lack this ability (Chamberlain *et al.*, 2007).

Proliferative ability

MSCs can be cultured *in vitro* for prolonged periods in an undifferentiated state and reach a lifespan of 75 to 90 cell doublings (Grove *et al.*, 2004), therefore they can only be maintained for a limited number of subcultures. Afterwards, a progressive reduction of proliferation occurs, so they are called Finite Cell Lines (Friedberg, 2006). This reduction in MSC is earlier in contrast to the ESCs where proliferative capacity is highly conserved due to an endogenous reverse transcription mechanism that allows them to maintain their stemness (Gelfand *et al.*, 2005). However, since there are no ESC cell lines of livestock species and the MSCs have similar characteristics, they are a useful model of study for research and development of technologies in breeding, cloning, and reproduction.

The MSCs *in vitro* present a cell cycle of three periods during the culture: 1) Delay Period, it lasts from 12 to 24 h, cells accumulate the cytoskeleton

se más temprana en contrastar a las CTE donde la capacidad proliferativa está alterada, con el hecho de que a un mecanismo de transcripción inversa endógena que les permite conservar sus telómeros (Colonna *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a que no existen líneas celulares de CTE de especies pecarías y las CTM poseen características similares, nos un modelo útil de estudio para la investigación y desarrollo de tecnologías en el campo de nanotecnología, genética, clonación y reproducción.

Las CTM *in vitro* presentan un ciclo celular de tres periodos durante el cultivo: 1) Período de Retención, días 12 a 24, las células reconstituyen el citoesqueleto y secretan proteínas de matriz extracelular para adherirse al plástico; 2) Fase Exponencial, donde la población celular se duplica, ocurren de varias veces durante el cultivo; 3) Fase Estacionaria, momento ideal para la inducción de la diferenciación celular al reducir su crecimiento.

Para determinar la capacidad de proliferación durante el cultivo se evalúan tres características: 1) número de duplicaciones celulares que es la cantidad de duplicaciones que ocurren en las células cultivadas en un tiempo determinado (Vidal *et al.*, 2005) y en experimentos con CTM de bovinos y porcinos hubo 40 a 50 duplicaciones acumuladas después de 10 a 15 subcultivos (Colonna *et al.*, 2005); 2) tiempo de duplicación celular que es el tiempo necesario para la duplicación de una célula y en CTM de equinos es 4.9±1.5 d para células del primer subcultivo (Vidal *et al.*, 2006); 3) curva de crecimiento celular acumulada que muestra el comportamiento de la célula a lo largo del cultivo respecto a su capacidad de proliferación.

En muestras de células aisladas de MC, la evaluación de estas tres características permite determinar la capacidad de autorrenovación, características indispensables para ser consideradas como CTM. En varias investigaciones se reporta tiempo de duplicación celular para las CTM de algunas especies coníferas; sin embargo, no existen criterios uniformes sobre las características de proliferación y tiempo de autorrenovación y la caracterización de dichos criterios.

Detección de proteínas de superficie

Para identificar los marcadores de superficie de las CTM se usan técnicas basadas en el uso de

and secrete extracellular matrix proteins to adhere to plastic; 2) Exponential Phase where the cell population is doubled, occurring several times during the culture; 3) Stationary Phase, the ideal time for induction of cell differentiation by reducing its growth.

To determine the proliferation capacity during culture, three characteristics are evaluated: 1) number of cell duplications which is the amount of duplications that occur in cells given a given time (Vidal *et al.*, 2005) and in experiments with MSC of bovinos and pigs there were 40 to 50 duplications accumulated after 10 to 15 subcultures (Colonna *et al.*, 2005); 2) time of cell duplication which is the time required for duplication of a cell, and in some MSC it is 4.9±1.6 d for first subculture cells (Vidal *et al.*, 2006); 3) a cumulative cell growth curve showing the behavior of cells throughout the culture with respect to their proliferative capacity.

In samples of cells isolated from BM, evaluation of these three characteristics allows to determine the self-renewal capacity, an essential characteristic to be considered MSC. In several studies, times of cell doubling/duplication for MSCs are reported for some domestic species; however, there are no uniform criteria on the characteristics of proliferation, being research and standardization of such criteria still required.

Surface protein detection

To identify the surface markers of MSCs, techniques are used based on the use of specific antibodies such as flow cytometry, immunocytochemistry (ICC), western blot, and immunocytochem microscopy. The main limitation of these techniques is the lack of a specific marker known to allow a proper identification and it is necessary to use a series of antibodies against antigens expressed preferentially (although not exclusively) in the MSCs. It is important to characterize the isolated population for which the ISIC in 2006 published a list that includes antibodies to identify the MSCs and HCs (Table 1).

This list does not only identify the MSCs, but taking into account the origin and type of tissue isolated, their presence can be inferred (Dorshkind *et al.*, 2005).

anticuerpos específicos como el método de flujo, inmunofluorescencia (IF), Western blot e inmunoenfoscopia electrónica. La mayor limitante de esos métodos es la falta de una molécula específica conocida que permita la identificación correcta y es necesario usar una serie de anticuerpos contra antígenos expresados de manera preferencial (siempre no exclusiva) en las CTM. Es importante destacar la población celular para la cual la BCF publicó en el 2005 un listado que incluye anticuerpos para identificar las CTM y las CE (Cuadro 1).

Este listado no identifica exclusivamente a las CTM, pero tomando en cuenta el origen y tipo de célula celular, se puede deducir su presencia (Domínguez *et al.*, 2006).

Los anticuerpos probados para determinar la identidad de las CTM de varias especies son usados como modelos de estudio para problemáticas clínicas del ser humano (Cuadro 2). Las investigaciones en medicina veterinaria y zootecnia son reducidas y no se han determinado los anticuerpos específicos de las CTM para cada especie, por lo cual se usan anticuerpos diseñados para los modelos animales empujados más frecuentemente (ratón, cerdo y humano). Lo anterior genera un área de oportunidad en la ciencia veterinaria para determinar los antígenos expresados en las especies domésticas y después diseñar los anticuerpos específicos, para facilitar la identificación de las CTM. Esto resuelve la confusión general en investigaciones donde la falta de especificidad a los anticuerpos por las CTM puede deberse a que carecen de la expresión de tales marcadores o el anticuerpo usado no lo reconoce. Rosenthal *et al.* (2000) en un panel de 43 anticuerpos determinaron que reaccionan positivamente en varias especies, y reportaron los anticuerpos CD29 L, W583, W445, CD56, W304 (CD345), W504 y 583L con reacción positiva en mono, cabra, borrego, cerdo y perro.

Anticuerpos usados en determinar la identidad de MSCs de varias especies son usados en modelos de estudio humano clínico (Tabla 2). Research in veterinary medicine and animal husbandry are scarce and the specific antibodies of the MSCs have not been determined for each species, thus antibodies designed for animal models most frequently studied (rat, mouse, and human) are used. This generates a field of opportunity in veterinary science to determine the antigens expressed in domestic species and then design the specific antibodies in order to facilitate identification of the MSCs. This would resolve the controversy generated in research where the lack of reactivity to antibodies by the MSCs may be due to the fact that they lack the expression of such marker or the antibody used does not recognize it. Rosenthal *et al.* (2000) in a panel of 43 antibodies, determined that they react positively in several species and reported the antibodies CD29 L, W583, W445, CD56, W304 (CD345), W504, and 583L with positive reaction in monkey, goat, sheep, pig, and dog.

Expression of transcription factors

In mammalian cells, the multipotentiality is controlled by the transcription factors Oct4, Nanog, Sox2, and Sox3; their expression is modified when the cell commits to a specific cell lineage by initiating expression of other genes. The expression of these genes in the MSCs is controversial because they are specific markers of ESCs.

However, the binding transcription factor 4 (Oct4) is present in the ESCs and in the MSCs. In murine cells, the expression of Oct4 and Nanog has been determined conferring their high proliferative ability and stability for prolonged periods (Jiang *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2009). Furthermore, the expression of these genes has been determined in different species (Table 3).

Cuadro 1. Anticuerpos utilizados para la identificación de las CTM.
Table 1. Antibodies used for the identification of the MSCs.

Positivo	Negativo
CD105 (endo glial)	CD34 (Marca el epitelio de progenitoras hematopoyéticas y células endoteliales)
CD73 (Endo / mesodermial)	CD45 (Marca las leucocitos)
CD90 (Tly-1)	CD16 y CD11b (Marca los expresados en neutrófilos y monocitos)

Cuadro 2. Marcadores a superficie en diferentes especies y sitios de aislamiento.
Table 2. Surface markers in different species and sites of isolation.

Modelos	Yerros Tejido	ML ¹ MO	Enl MO	U ² MO	U ³ UES	U ⁴ TA	S ⁵ AC	S ⁶ De	S ⁷ MO	S ⁸ TA	C ⁹ MO	C ¹⁰ AC
30x1		NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	-
CD46 (MLAa2)		NE	NE	-	NE	+	+	NE	NE	NE	NE	NE
CD29 (MLAa)		+	+	+	+	+	+	+	NE	NE	NE	+
CD9		NE	NE	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CD75		+	NE	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
U180		NE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD13		+	NE	+	+	+	+	NE	+	+	+	+
CD36 (ACDC4E)		NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CD44 (ACAM)		+	NE	+	NE	+	+	NE	+	+	NE	+
CD44		NE	-	-	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	-
CD51 (PTAM)		-	NE	-	NE	-	-	NE	NE	NE	NE	-
CD6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD31		-	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-
CD63		-	-	-	NE	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE
CD135 (ALCAM)		NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	+
CD136 (MCM4)		-	+	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE

¹Bain (Greenly y Meko, 2002). ²Rao (Greenly *et al.*, 2000). ³Huano (Serra *et al.*, 2005). ⁴Ali *et al.*, 2011. ⁵Kazuo *et al.*, 2007. ⁶Huano (Serra *et al.*, 2005); Ken *et al.*, 2008). ⁷Huano (Ken *et al.*, 2008). ⁸Carlo Zeng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2005). ⁹Carlo Zeng *et al.*, 2006. ¹⁰Gao (Quany *et al.*, 2011). ¹¹Peter (Chali *et al.*, 2007). ¹²Benay (McGarry *et al.*, 2005). MO, músculo (en UCB, significa umbilical); Enl, TA, tejido adiposo; De, dentado; +, ECQ positivo; - ECQ negativo; NE no evaluado; * Muestra (Control) MO; 2009). ¹³Ra (Cavali *et al.*, 2008). ¹⁴Huano (Serra *et al.*, 2005; Fukui *et al.*, 2001; Kazuo *et al.*, 2007). ¹⁵Huano (Serra *et al.*, 2005); Ken *et al.*, 2008). ¹⁶Huano (Ken *et al.*, 2008). ¹⁷Ping (Zeng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003; Huano *et al.*, 2007). ¹⁸Ng (Oster *et al.*, 2001). ¹⁹Ch (Quany *et al.*, 2011). ²⁰Dog (Kubo *et al.*, 2007). ²¹Shop (McGarry *et al.*, 2005). MO: biomarcador UCB; músculo (en UCB, significa umbilical); Enl, tejido adiposo; De, dentado; +, ECQ positivo; - ECQ negativo; NE: no evaluado.

Expresión de factores de transcripción

En las células de mamífero la multipotencialidad está bajo control de los factores de transcripción Oct4, Nanog, Sox2 y Klf4 en expresión de modo endógeno lo cual es comparable a un linaje celular específico iniciando la expresión de otros genes. La expresión de estos genes en las CTM es transicional porque son marcadores particulares de CTE.

Sin embargo, el factor de transcripción vinculado a (Oct 4) está presente en las CTE y en las CTM. En células humanas se ha determinado la expresión de Oct4 y Nanog lo que confiere una capacidad por flexibilidad y estabilidad durante períodos prolongados (Jin *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). Además se ha determinado la expresión de estos genes en diferentes especies (Cuadro 3).

A excepción de las investigaciones realizadas en CT de cerdos, aves y equinos (Vielmi *et al.*, 2009), en las demás especies domésticas la determinación de estos factores de transcripción se ha limitado a CTE. La identificación de la expresión de dichos

With the exception of research performed in SCs of pig, birds, and horses (Vielmi *et al.*, 2009), in the other domestic species, determination of their transcription factors has been limited to ESC. The identification or expression of these factors in the SSCs in domestic species would give further information on the self-renewal and differentiation capacities of these cells, as well as the expression patterns that determine such capacities. Furthermore, the use of transcription factors for the generation of pluripotent cells, induced by recombinant DNA technology, will allow the generation of cell lines of SSCs with a greater capacity for proliferation and differentiation. Lines generated in this way would have applications in the study of the mechanisms involved in aging, lung metabolism, tissue engineering, and cell differentiation.

Multipotentiality

MSCs have the capacity to differentiate into various tissues, considering both the adipogenic

Cuadro 3. Expresión de factores de transcripción en CTCs de diferentes especies y tejidos.
Table 3. Expression of transcription factors in SSC of different species and tissues.

	C/Myb ¹ AKC	Myb ² MO	Thes/Myb ³ AKC	Thes/Myb ⁴ TA	Thes/Myb ⁵ dermis	Thes/Myb ⁶ corneal
Oct-4	+	+	+	+	+	+
Nesog	+	+	+	+	+	+
Sox2	+	+	+	+	+	+
Sox39	NE	NE	+	NE	NE	NE
Sox1	NE	NE	+	NE	NE	NE
Sox4	NE	NE	+	+	+	+

¹Val et al. (2003), ²Narita et al. (2008), ³Amis et al. (2011), ⁴Bhattacharya et al. (2009), ⁵Chen et al. (2010), ⁶Chen et al. (2010). TE: tejido adiposo. ⁷Corneal: los tejidos. + Expresión positiva registrada. NE: no expresado. ⁸Chen et al. (2010), ⁹Chen et al. (2010), ¹⁰Bhattacharya et al. (2009), ¹¹Amis et al. (2011), MO: corneal tissue. TA: adipose tissue. ¹²Narita et al. (2008), ¹³Amis et al. (2011), ¹⁴Reproductive system. NE: not evaluated.

factores en las CTCs en las especies domésticas brindará mayor información sobre las capacidades de autorrenovación y diferenciación de estas células, así como los patrones de expresión que determinan tales capacidades. Además, el uso de los factores de transcripción para la generación de células pluripotenciales, inducida mediante tecnología de ADN recombinante, permitirá la generación de líneas celulares de CTCs con una mayor capacidad de proliferación y diferenciación. Las líneas generadas de esta forma tendrán aplicaciones en el estudio de los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo, ingeniería de tejidos y diferenciación celular.

Multipotencialidad

Las CTCs poseen la capacidad de diferenciarse a diversos tejidos, considerándose básica la capacidad adipogénica, osteogénica y condrogénica; pero no está limitada a esos límites. Diversos investigadores han logrado la diferenciación a miocardiocitos (Dezawa et al., 2008), adipocitos espelútricos (Dezawa et al., 2005; Akavia et al., 2008) y hueso (Narita et al., 2008), células endoteliales, hepatocitos (Zeng et al., 2006), células β pancreáticas (Liu et al., 2010), células gliales y neuronas (Shiomi et al., 2007; Ji et al., 2009).

Para inducir la diferenciación es necesario imitar el microambiente de los tejidos *in vivo* usando medios de cultivo con nutrientes, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento (incluidos en suero animal o adicionados) y algunas compuestos sintéticos.

específica, and pluripotent capacity, but are not limited to these lineages. Various investigators have achieved the differentiation into cardiomyocytes (Akavia et al., 2008), skeletal (Dezawa et al., 2005; Akavia et al., 2008) and cartilage (Narita et al., 2008), myocytes, endothelial cells, hepatocytes (Zeng et al., 2006), β -pancreatic cells (Liu et al., 2010), glial cells, and neurons (Shiomi et al., 2007; Ji et al., 2009).

To induce differentiation it is necessary to imitate the microenvironment of the tissues *in vivo* using culture media with nutrients, hormones, cytokines, growth factors (included in animal serum or added), and some synthetic compounds.

In the differentiation of MSCs to cardiocytes, fetal bovine serum, dexamethasone, β -glycerol phosphate, and ascorbic acid are added to the culture medium; the differentiation to cardiocytes is induced by the transforming growth factors β 1 and 3 (TGF- β), TGF- β 3, mesoprogenetic growth factor 4 (BMP4), insulin, transferrin, and sodium selenite (ITS) and the adipogenic differentiation uses dexamethasone, indomethacin, insulin, and insulin-like growth factor (IGF) (Steininger et al., 1999).

The evaluation of the capacity of differentiation of MSCs is carried out with laboratory techniques and they include use of specific staining for bright field microscopy (BFM), enzyme activity tests, immunocytochemical techniques [Western blot (WB), immunocytochemistry (ICC)], microscopy and electronic immunomicroscopy (MET, I-MET), and molecular biology (RT-PCR, PCR and real time

En la diferenciación de CTM a osteocitos al medio de cultivo se agregan: suero fetal bovino, *osteonectina*, β -glicerosólfato y ácido ascórbico, la diferenciación a condrocitos se induce con los factores de crecimiento transformante β y 3 (TGF- β , TGF- β 3) proteína morfogenética 3 (BMP3), transferrina y selenio de sodio (ITS) y la diferenciación adipogénica utiliza *osteonectina*, indometacina, insulina e hidroxi metil xantina (BMD3) (Piranga *et al.*, 1999).

La evaluación de la capacidad de diferenciación de las CTM se lleva a cabo con técnicas de liberación e inducción al uso de marcadores específicos para microscopía de campo claro (MCC), pruebas de vitalidad colorimétrica, células inmunocitofluores [Western blot (WB), inmunocitoquímica (ICQ)] citometría de flujo (FACS) (MTC + MET) y biología molecular (RT-PCR, PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR), y microarreglos de ADN) (Cusack 4).

La multipotencialidad convierte a las CTM en modelos de investigación para la terapia celular, ingeniería de tejidos, inmunomodulación, estudios de metabolismo y diferenciación celular, así como de sustancias que los modifiquen. En el área clínica se les puede utilizar en aplicaciones como enfermedades crónicas degenerativas (degeneración de rodilla y codo en perros), lesiones articulares (artritis y fracturas en caballos), mientras que en la medicina

de regenerativa (qPCR), and DNA microarray) (Table 4).

The multipotentiality makes the MSCs in research models for cell therapy, tissue engineering, immune modulation, studies of metabolism and cell differentiation, as well as the use of substances that modify them. In the clinical area, they can be used in applications such as chronic degenerative disease (hip and elbow dysplasia in dogs), joint injuries (arthritis and fractures in horses), while in animal husbandry, the use of the multipotentiality of the MSCs to evaluate drugs that modify cell differentiation and metabolism will allow obtaining substances that modify the characteristics of meat.

CONCLUSIONS

The validation of results obtained in experiments with mesenchymal stem cells is necessary and it is imperative to use different methods for their characterization. Within the characterization the ability to adhere, to proliferate, proliferative capacity, and multipotency are well defined for mesenchymal stem cells, while expression of surface markers and transcription factors is conventional since no specific marker is known and these genes are considered as markers of embryonic stem cells.

Cuadro 4. Técnicas empleadas en el análisis de la diferenciación celular de las CTM y las características encontradas.

Table 4. Technique used in the analysis of cell differentiation of the MSC and the characteristics found.

Grupo	Características encontradas	Técnicas
Adipocitos	Diferenciación por lipogénesis Lípidos de gotas lipídicas Especificidad y síntesis de triglicéridos (TG) (LPS)	MCC (incubación con rojo cristalino) ¹ MET ² PCR, qPCR, WB, ICQ ^{3,4}
Condrocitos	Diferenciación por proteoglicanos y colágeno tipo II Especificidad y síntesis de SO ₂ , glicosaminoglicanos y colágeno tipo II	PCR (incubación con rojo cristalino) ¹ I-MET ² PCR, qPCR, WB, ICQ ^{3,4}
Osteocitos	Diferenciación por osteocalcina osteonectina Especificidad y síntesis de osteocalcina y osteopontina	MCC (incubación con rojo cristalino e Von Kossa) ¹ PCR, qPCR, WB, ICQ ^{3,4}

¹Elkhatib *et al.* (2002), ²Elkhatib y Qadiri *et al.* (2009), ³Burrows y Qadiri *et al.* (2005), ⁴Zhang *et al.* (2005), ⁵Salazar y Nishi (2006), ⁶Martinez *et al.* (2002), ⁷Calk *et al.* (2007).

el aprovechamiento de la multipotencialidad de las CTM para evaluar fármacos que modifiquen los procesos de diferenciación celular y metabólica permitan obtener sustancias que modifiquen las características de la célula.

CONCLUSIONES

La validación de los resultados obtenidos en experimentos con células madre es imprescindible en la ciencia y es importante usar diferentes métodos para su caracterización. Dentro de esa caracterización, la capacidad de adherencia al plástico, la capacidad proliferativa y multipotencialidad están bien definidas para las células madre es multipotenciales, mientras que la expresión de marcadores de superficie y marcadores de transcripción es controversial, porque no se conoce un marcador específico y ya ciertos genes se consideran como marcadores de células madre en embrionarias.

Sin embargo, las propiedades de las células madre autenocómicas las hacen un modelo ideal para la investigación en medicina donde se pueden usar en estudios sobre calidad de vida y comparaciones preclínicas, así como en el desarrollo para la regeneración e integridad de tejidos. Los puntos anteriores serán abordados en la segunda parte del presente ensayo.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo ha sido financiado por el Programa PAICYT (CONCYTEG) (UNAM, México). Este trabajo es parte de la tesis doctoral (UNAM) de los autores: autores quienes agradecemos al igual forma a los instructores: autores egresados al CONCYTEG la bien merecida en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM, México)

LITERATURA CITADA

Moran, U. D., O. Mendlik, and D. Benayahu. 2008. Computing the in vivo protein profile of mesenchymal cells (MSCs) and shared mouse cells. *J. Cell. Physiol.* 215: 669-672.

Morales, A., D. Díaz, y V. Rodríguez. 2007. Las células madre: una nueva característica biológica y aplicación. *Avances Salud* 5: 77-84.

Ri, V. K., Gong, X., Zhang, X., Zhang, W., Jiang, Y., Zhang, J., Chen, S. L., y Huang, T. L. 2003. Prostate cancer stem cell: signaling pathway, survival, and treatment of metastatic disease. *Curr. Gene Ther.* 3: 401-431.

Sancho de la Rosa, C. C., E. Galano, A. Hidalgo, y T. Arceley-

However, the properties of mesenchymal stem cells make them an ideal model for research in animal husbandry where they can be used to study on their quality and productive performance, as well as in the clinical use for tissue regeneration and reprogramming. The above points will be covered in Part II of this essay.

—End your article review—



2008. Cellular response to the oral diet: a transcriptional and proteomic response. *Metabolism (Berl)* 57: 435-49.

Hirata, R. M., Buitrago, S., Gonzalez, and E. G. Sobey. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 109-122.

Bozzard, D., M. Marino, G. Kim, S. Takagi, M. Okamura, and T. Nakagawa. 2007. Isolation and multipotential differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 309: 343-350.

Carvalho, A. L., D. L. Quaradima, L. V. Dias, P. H. Santos, E. C. Mankikian, S. G. Carvalho, S. D. Assis, B. G. Cordeiro, L. M. Fontana, G. M. Santos, W. F. Rizzato, C. M. Takita, A. C. de Carvalho, and R. G. Goldhazer. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a new cellular therapy for complex function in a murine model of severe chronic bronchitis. *Stem Cells* 26: 1307-1314.

Crambell, R. J., J. Lee, B. Adams, and J. Muddiman. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, and therapeutic potential. *Stem Cells* 25: 2799-2809.

Colzani, S., G. D'Amico, I. Liguori, S. Di Caro, E. Cilli, and G. Iaconi. 2006. Mesenchymal differentiation, osteopontin, and osteocalcin, and nuclear matrix of bone and post-natal mesenchymal stem cells. *Chong Ching* 7: 154-165.

Guo, C., L. Min, A. Mohrman, M. Ye, and M. S. Strachan. 2007. Characterization, propagation and adipogenic of bone mesenchymal stem cells: a histological, morphological and immunofluorescence study. *Histochem. Cell Biol.* 128: 507-523.

de Siqueira, M. L., E. C. Chagnacchia, and N. B. Bessa. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *J. Cell. Mol. Biol.* 27: 4-17.

Dewez, M., E. Ishikawa, Y. Ichizumi, T. Yoshizumi, M. Hoshino, S. Takada, C. Ito, and Y. Nishimura. 2010. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309: 311-317.

Diaz, C. M., E. de la Rosa, J. Morales, J. Lopez-Camacho, J. Mendel, D. Franco, S. Deana, A. Soriano, D. J. Probst, and E. Hossain. 2006. Altered function for self-renewal of bone mesenchymal stem cells. The functional society for cell and tissue specific stem cells. *Cytotechnology* 8: 315-327.

Dong, S. W., J. L. Yang, S. J. Duan, Z. Xie, Z. J. Yu, C. L. Zhu, R. Yang, and J. S. Sun. 2009. Bone regeneration using mesenchymal stem cells derived from bone marrow mesenchymal

stem cells expressing CD44^{hi}CD133^{hi}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 2226–2234 (2008).

Emamirooz, M. B. and S. Nishi. 2005. Murine mesenchymal stem cell survival and expansion in low and high density culture require surface antigen expression and integrin clustering. *Cell Adhesion and Migration* **9**, 451–461.

Emamirooz, M. B., F. Nazarian, F. Faridi, J. Taghvaei, and M. E. Jandaghian. 2009. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from goat bone marrow. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **12**, 75–79.

Emami-Panahi, E., J. J. Mirzabakhsh, H. Mirzad, 2005. Culture media for mesenchymal stem cells. *Biologia y aplicaciones* **10**, 386–391.

Faust, J. K., M. Zaki, J. Wang, and Z. Allison. 2008. Adipogenic differentiation of bone marrow-derived multipotential mesenchymal stem cells. *Methods and protocols* **11**, 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470399895.ch11>

Fitzpatrick, R. J. 2006. Basic principles of cell culture. In *Vitro Cell Developmental Biology*, ed. R. J. Fitzpatrick (Ed). *Current Cell Culture Protocols*, 141–144. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 141–144.

Ganad, M. and Miao, L. 2009. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, and investigation, and production of conditioned medium. *In Adipocytes and Wound Healing*, Scott Cole in Regenerative Medicine, Humana Press New York, New York, pp. 281–294.

Green, J. E., E. Bevilacqua, and D. S. Knäuper. 2004. Viability of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* **22**, 407–411.

Hanson, S., N. Abumayyeh, B. Graflich, and J. Guo. 2011. Mesenchymal stem cell expansion, stem cells from fibroblasts are transplanted into a porous scaffold. *Stem Cells Dev.* **21**, 3566–3576.

Hendrix, A. M., H. E. Lantsovsk, J. M. Robi, B. S. Skaruppa, and P. Colter. 2002. Bone marrow-derived multipotential adult mesenchymal stem cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 685–689.

Hu, Q., C. Wang, and G. Li. 2007. Genetic analysis and lipid content measurement of stem cells. *Stem Cells* **25**, 61–77.

Imboden-Dawson, S., S. Pang, J. A. Roberts, A. Sathar, E. Allford, P. Poon, M. Kaptein, S. Senozon-Graeff, A. Makris, and M. Lee. 2002. Adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: potential applications. *J. Mol. Med. (Berl)* **82**, 150–164.

Jain, C. R., M. Srivastava, G. Cao, D. Chandra, L. Panigrahi, C. Liu, T. C. Johnson-Davis, H. Zacharia, G. Q. Dales, and D. C. Ho. 2003. In vitro and in vivo characterization of multipotential stem cells derived from adipose tissue. *Stem Cells* **21**, 395–403.

Jiang, Y., P. N. Kakihira, T. J. Reinhardt, R. E. Siskinn, C. D. Korte, K. R. Oelschläeger, M. Ryan, T. Joseph, T. J. Long, M. Bachand, J. Du, S. Akhavan, A. Loring, W. C. Liaw, H. A. Cappuccino, and C. M. Verfaillie. 2001. Multipotency of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Nature* **409**, 47–51.

Kondo, E., A. Chao, C. Goto, O. Sajiya, S. Yoshida, and H. Sakai. 2001. A comprehensive characterization study of human bone marrow cells with an emphasis on molecular and functional properties. *J. Cell Physiol.* **126**, 376–382.

Lee, S. J., T. Kohler, J. Alvarez, J. E. Kim, and K. T. Hoang. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose, and cord blood-derived adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1596–1601.

Leibin, M., T. D. O'Brien, J., and M. Sharma. 2009. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev.* **19**, 1455–1464.

Liang, D., S. Banerjee, A. Ahmed, Y. Li, Z. Wang, S. Song, and H. Li. 2009. Epitalkin in mesenchymal stromal cells is predominantly linked with stem cell signature in prostate cancer cells. *PLoS One* **4**, e4946.

Lin, S., M. H. F. Jia, J. C. Kim, S. A. Celi, Y. Hong, S. Takahashi, S. Y. Chen, and G. J. Bao. 2007. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos associated with fetal development and mesenchymal stem cells. *Dev. Dyn.* **236**, 433–440.

Miyata, T., M. Kuroki, S. Watanabe, K. Nishikawa, Y. Takemura, H. Mikiyoshi, M. Goto, T. Okada, A. Ueda, S. A. Nawa, T. Shimoyama, Y. Nakashima, T. Nakamura, Y. Nishikawa, Y. Fujisaki, and M. Demura. 2005. Unique multipotential capacity: human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 8639–8644.

Oh, Y. J., S. J. Kang, G. H. Moon, M. J. Kim, J. K. Park, T. S. Kim, S. H. Ryan, E. S. Lee, and C. J. Kim. 2010. Developmental ability of multipotential adipogenic bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Res.* **24**, 256–262.

Ortiz, S. T., M. Casadevall, A. E. Bhatia, A. Saba, A. M. Mosley, S. Ueda, D. E. Mutha, and A. W. Haynes. 2003. Human mesenchymal stem cells can undergo osteogenic lineage differentiation in a murine complementation assay. *Nat. Med.* **9**, 1282–1287.

Palmer, M. J., J. Krause, J. Robson, and T. Schenke. 2001. Mesenchymal stem cell survival and self-renewal: implications for their biology. *Trends Mol. Med.* **7**, 367–373.

Qin, C., L. Y. F. Lu, W. J. Li, H. H. Z. Xiao, C. G. Sun, S. Yi, X. X. Yang, F. Q. Zhang, Y. L. Gu, Y. P. Shi, and S. Li. 2008. Differentiation of human-derived fibroblasts and fibrocytes into stem cells. *Chin. Med. J. (Engl.)* **23**, 3343–3351.

Royak-Schäfer, M. K., M. A. Thiele, J. O. Niggli, M. Kottmann, and S. T. Geiger. 2005. Phenotypic and functional comparison of cultured stem cells derived from mesenchymal stromal tissue and marrow cells. *J. Cell Physiol.* **106**, 57–66.

Saito, S., S. A. Moshay, E. S. Gupta, R. Baruch, and S. Teitel. 2002. Epigenetic regulation of stem cell differentiation of bone marrow-derived multipotential mesenchymal stem cells. *Humana Exp. Regn. Med.* **1**, 369–377.

Sandoz, S. C., S. Chiu, C. Delmonico. 2005. Mesenchymal progenitor cells reside within mesenchymal stem cell niches in adipose. *Development* **132**, 1227–1236.

Sharma, S. D., S. Ghosh, A. L. Zimmerman, R. S. Jones, and C. J. Kim. 2009. Characterization and developmental potential of adipogenic marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.* **121**, 524–530.

Suzuki, Y., A. Yamazaki, H. Sugiura, M. Ueda, and Y. Ueda. 2008. Effect of transforming growth factor- β 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into mesenchymal cell lineage. *Cell Trans. Res.* **18**, 449–458.

Neill, S., E. Reeves, M. Wright, I. Thorne, and W. Johnson-Davies. 2004. Functional expression of EGF and EGF Receptor in rat adult human mesenchymal stem cells suggests a role of neoblastic transgenic and wound healing Stem Cells 12:425-434.

Oh, S. A., J. G. Jung, and D. E. Bhu. 2007. Cooperative characterization of genetic mesenchymal stem cells derived from bone marrow, connective tissues. *Tissue Eng Part C Methods* 14:48-59.

Pittenger, M. E., A. M. Mackay, S. C. Scadden, R. Kalland, R. Douglas, I. G. Moses, M. A. Moerman, G. W. Spector, S. Geng, and D. S. Mizruchi. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.

Quarles, J. S., J. L. Webb, D. S. Gibbons, and S. W. Dowd. 2011. Evaluation of autologous mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in animal models. *J. Natl. Med. Surg.* 11: 118-126.

Sakuma, H., T. Sakuma, Y. Nakayama, M. Higashijima, S. Ikenovska, I. Mizumoto, S. Mizuno, and J. Anzai. 2005. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and brain. *Stem Cell Res.* 5: 378-388.

Schmidha, J., H. J. Park, B. Stangor, J. Stock, H. J. Eitinger, and A. C. Murray. 2009. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple stem cell niches using a non-invasive anti-human monoclonal antibody. *Stem Cell Dev.* 19: 1911-1921.

Singam, K., L. Harous, A. Kesting, W. L. Stanford, and J. E. Davies. 2007. Human mesenchymal stem cell-derived nerve cell differentiation and up-regulation of neurotrophic factors. *PLoS One* 2: e3693.

Shino, M., T. Ueda, M. Hasegawa, S. Itoh, S. Tsuchiya, H. Fujino, H. Kobayashi, T. Kato, K. Umeki, M. Yoshizawa, and T. Nishikawa. 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with osteogenic and neurogenic properties. *Exp. Cell Res.* 317:1118-1125.

Sunm, S., M. K. C. Hick, M. Zhu, J. Widar, Z. Aksoy, S. B. Schaefer, J. X. Yuan, and M. H. Peckol. 2005. Multilineal differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Exp. Cell Res.* 311:182-191.

Tan, X., G. Yoshida, and S. Jia. 2005. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Advances Bio-Tech.* 5: 23-45.

Vidal, M., A. G. de Brito, J. R. Johnson, M. J. Lopez, K. M. Moore, and J. M. Garcia. 2005. Cell growth characteristics and differentiation capacity of adipose-derived bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: response and storage capacity. *Wound Surg.* 11: 600-611.

Yokoi, S., T. Kamei, L. E. Hunt, C. Gomi, and S. Marini. 2009. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-induced expression of bone morphogenetic protein-2 promotes differentiation by repressing expression of PAX3. *PLoS One* 4:e4110.

Zhang, Y., D. Kim, J. Debing, and E. Teramachi. 2012. Mesenchymal modeling, the core and cytoskeletal core, of human mesenchymal stem cells. *Scientific World Journal*. doi: 10.1080/2026798822.

Zeng, L., E. Kaurama, Q. Hu, C. Li, L. Sridhar, M. Selma, T. D. O'Brien, J. Zhang, and C. Verfaillie. 2006. Multipotent progenitor cells from umbilical cord. *Stem Cells* 24:2585-2593.

CÉLULAS TRONCALES MESENCQUIMALES: BIOLOGÍA, CARACTERIZACIÓN Y FUTURAS APLICACIONES EN SALUD Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES DOMÉSTICAS Y PECUARIAS. PARTE II

MESENCHYMAL STEM CELLS: BIOLOGY, CHARACTERIZATION AND FUTURE APPLICATIONS TO ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION OF DOMESTIC SPECIES AND LIVESTOCK. PART II

Rosa M. Pérez-Soto¹, José J. Becerra-Sotomayor¹, Araceli de Sotomayor², Anad Amadorán³, Enrique Pittó⁴, Otilio Nieto^{5,6*}

Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México; ¹Laboratorio de Anatomía y Fisiología, Universidad Autónoma de México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Blvd. Juan de Dios Cuautitlán, estado de Querétaro, 75210, México; ²Centro de Investigación y Desarrollo en Neurobiología, UNAM, Blvd. Juriquilla 3951, Querétaro, estado de Querétaro, 76210, México; ³Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, Ciudad de México, Av. Universidad 3000, D.F. 0451, México;

RESUMEN

Las células troncales mesenquimales poseen capacidad proliferativa alta y potencial de diferenciarse a diversos linajes celulares. Estas cualidades las hacen un modelo biológico ideal en el estudio y desarrollo de la medicina regenerativa para su uso en la medicina veterinaria y en la zootecnia. En este artículo se analiza la información disponible sobre las células troncales mesenquimales de especies domésticas y se discuten posibles usos actuales y futuros en la medicina veterinaria y la zootecnia en: ingenuidad y regeneración de tejidos, tratamiento de enfermedades crónicas, generación de animales con mejores características productivas, reproducción asistida de animales genéticamente superiores o en peligro de extinción y mejor entendimiento de los procesos de desarrollo y metabolismo celular de las especies domésticas.

Palabras clave: células troncales mesenquimales, células, diferenciación celular, multipotencialidad, producción animal, células madre.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las células troncales en la década de 1950 y la identificación y caracterización posterior de un *clon*

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells are highly proliferative and have the potential to differentiate into several cell lineages. These qualities make them an ideal biological model in the study and development of biomedical tools for use in veterinary medicine and animal production. This paper reviews the information available on mesenchymal stem cells in domestic species and their possible uses, present and future, for veterinary medicine and animal production engineering and tissue regeneration, treatment of chronic diseases, generation of animals with better production characteristics, assisted reproduction of genetically superior animals or at risk of extinction and better understanding of the processes of cellular development and metabolism of domestic species.

Key words: mesenchymal stem cells, bone marrow cell differentiation, multipotency, animal production, cell therapy.

INTRODUCTION

Since the discovery of stem cells in the 1950s and the later identification and characterization of mesenchymal stem cells (MSC), a large body of information and research has been generated on the biology and possible applications of these cells, focused mainly on human health (aging and injury), or even humans, as a model. In other domestic species, the research done has been limited mainly to cases in which a species is a model compatible with normal physiology or a human disorder. The availability

*Autor responsable. ✉ Autor for correspondence.
E-mail: otnieto@vetvet.unam.mx
Publicado en línea por ARJOL en Agrociencia 46: 543-553, 2012.

mente mesenquimales (CTM) se ha generado gran cantidad de información e investigación sobre la biología y las posibles aplicaciones de estas células, centrándose a la salud humana, y usando como modelos ratas y monos o al propio humano. En otras especies domésticas la investigación se ha limitado principalmente en ratas en las que alguna especie es un modelo compatible con la fisiología normal o alguna patología humana, la existencia de estos modelos ha promovido el estudio, aislamiento y caracterización de células mesenquimales de médula ósea (MOC) de las principales especies de animales veterinarios y pecuarios (Ceballos *et al.*).

Debido a su capacidad proliferativa alta y de diferenciación a diversos tejidos, las CTM se usan experimentalmente para evaluar el efecto de la terapia celular sobre infarto e isquemia de miocardio (Jung *et al.*, 2006; Gardolf *et al.*, 2011), reconstrucción de válvulas cardíacas, degeneración de discos intervertebrales, reparación de fracturas, reconstrucción de cartílagos, lesiones en médula espinal (Jung *et al.*, 2009) e osteoartritis (Boothfield *et al.*, 2010).

Caracterización de células troncales mesenquimales de médula ósea de especies domésticas

Caninos

Cook *et al.* (2007) caracterizaron CTM de MO de perro y encontraron una reacción positiva a los marcadores de CTM CD105 y CD90 y negativa para los marcadores de células hematopoyéticas (HC) CD34 y CD45. Además diferenciaron las células aisladas a osteocitos, condrocitos y adipocitos. En ese estudio, las células diferenciadas a condrocitos se observaron ordenadas en nódulos con células hipertróficas en el centro y células de morfología fibroblástica en la periferia, similar a la morfología del cartilago in vivo.

Felinos

Merín *et al.* (2002) aislaron y caracterizaron CTM de MO felina y la frecuencia de esas células fue $1 \text{ en } 4.7 \times 10^4$ a $1 \text{ en } 5.9 \times 10^5$ células del total de células aisladas. Las células expresaron los marcadores de CTM CD9 y CD44 y fueron negativas para el marcador de HC CD45, además de diferenciar estas

de estas células ha promovido el estudio, aislamiento y caracterización de troncos mesenquimales (CTM) de las principales especies de interés en medicina veterinaria o animal productiva (Ceballos *et al.*).

Debido a su capacidad proliferativa alta y de diferenciación a diversos tejidos, las CTM se usan experimentalmente para evaluar el efecto de la terapia celular sobre infarto e isquemia de miocardio (Jung *et al.*, 2006; Gardolf *et al.*, 2011), reconstrucción de válvulas cardíacas, degeneración de discos intervertebrales, reparación de fracturas, hip displasia, spinal cord lesion (Jung *et al.*, 2009) osteoartritis (Boothfield *et al.*, 2010).

Caracterización de células troncales mesenquimales de médula ósea de especies domésticas

Caninos

Cook *et al.* (2007) caracterizaron CTM de MO de perro y encontraron una reacción positiva a los marcadores de CTM CD105 y CD90 y negativa para los marcadores de células hematopoyéticas (HC) CD34 y CD45. Además diferenciaron las células aisladas a osteocitos, condrocitos, and adipocitos. En ese estudio, las células diferenciadas a condrocitos se observaron ordenadas en nódulos con células hipertróficas en el centro y células de morfología fibroblástica en la periferia, similar a la morfología del cartilago in vivo.

Felinos

Merín *et al.* (2002) aislaron y caracterizaron CTM de MO felina y la frecuencia de esas células fue $1 \text{ en } 4.7 \times 10^4$ a $1 \text{ en } 5.9 \times 10^5$ células del total de células aisladas. Las células expresaron los marcadores de CTM CD9 y CD44 y fueron negativas para el marcador de HC CD45. They also differentiated these cells into adipocytes and osteocytes. Quimby *et al.* (2011) report similar results in this family for differentiation into adipocyte and osteocytes, and further to chondrocytes.

Equinos

In equines, Vidal *et al.* (2009) determined the proliferation and differentiation capacity of MSC. Cell duplication time was $14 \pm 0.26 \text{ d}$, achieving

Cuadro 1. Células mesenquimales mamarias (MCM) de mamíferos (MO) de especies domésticas en un medio biológico.

Table 1. Mammary mesenchymal cells (MSC) from home mammals of domestic species in biological media.

Especie	Medio	Referencia
Ovino	Medio de cultivo con suero	Quincey, 2011
Caprino	Taguerón de células y regeneración de un lago	Quintero et al., 2002; Liu, 2003
Ovino	Taguerón de células y regeneración de un lago	Blades, 2004; Visciano et al., 2007
	Regeneración de células de cultivo	Vicente et al., 2007
Porcino	Cultivo de células madre	Slata, 2002; Huang, 2006
	Regeneración de suero	Banka, 2009
Equino	Taguerón de células madre	Kuo, 2004; Chou et al., 2005
	Taguerón de células y regeneración de un lago	Fournier et al., 2005; Zhu, 2008
Canino	Regeneración de suero	Blanco et al., 2005; Li, 2009
	Tuercamiento de células madre	Jiang, 2009
	Formación de células	Kuo, 2003
	Cultivo de células madre	Slata, 2005
Asno	Cultivo de células madre	Elank, 2011
	Taguerón	Hsu, 2011

células adipocíticas y pericitos (Quinby *et al.*, 2001) reportan resultados similares con esta especie para la diferenciación a adipocitos y pericitos, y también a condrocitos.

Equinos

En equinos Vidal *et al.* (2006) determinaron la capacidad de proliferación y diferenciación de las CIM y el tiempo de duplicación celular fue de 20-26 h, alcanzando 30±7.4 duplicaciones celulares por el séptimo pasaje. Además, se diferenciaron las CIM de células a los lipos adipocitos y a los

Porcinos

Las células mesenquimales de MO de los porcinos incrementa su número a un ritmo regular hasta el séptimo pasaje y en los pasajes subsiguientes disminuye hasta el octavo cuando pasa, cuando el crecimiento celular se detiene, alcanzando alrededor de 40 duplicaciones (Collison *et al.*, 2005). Las células aisladas muestran capacidad de diferenciación adipocítica y ósea, mientras que cultivos tratados con 2-mercaptoetanol, además de presentar acumulo de grasas lipídicas formaban un depósito en el cultivo y algunas células presentaban vacuolas en su citoplasma, las cuales indican diferenciación adipocítica en estas células. Otras células con el mismo aspecto se observaron al e multiplicadas, además de expresar el gen para

30±2.4 cell duplications by the sixth passage. They also differentiated the isolated MSC into adipogenic and mesogenic lineages.

Pigs

Bovine mammary mesenchymal cells of pigs increase in number at a regular rhythm until the sixth passage and decrease in subsequent passages until the 7th passage when cell growth ceases, achieving around 40 duplications (Collison *et al.*, 2005). The isolated cells exhibited the ability to differentiate into adipocytes and osteocytes, while cultured cells treated with 2-mercaptoethanol, besides having an accumulation of lipid drops, formed multi-layers and some cells had vacuoles in their cytoplasm, indicating differentiation into adipocytes. Other cultures treated with the same reagent were observed to be bi- or multi-nucleated, as well as expressing the gene for the myosin heavy chain, a marker for muscle differentiation (Collison *et al.*, 2005).

The MSC from pig and postnatal bovine mammary samples possess the ability to proliferate about 20 cell duplications (Zeng *et al.*, 2008). An important finding was that some of the isolated clones from postnatal samples expressed Oct3/4, a highly important transcription factor in maintaining cell pluripotency during the embryo stage (Abu-Isa et al., 2010); this expression remains stable even after 90 cell duplications. The cells isolated by

la cadena pesada de miostatina en favor de la diferenciación muscular (Colbran *et al.*, 2005).

Las CTM de muestras de MO por y postnatales poseen una capacidad de proliferación superior a las 30 duplicaciones celulares (Zeng *et al.*, 2006). Un hallazgo importante fue que algunas de las clones aisladas de muestras perinatales expresan CD34, un factor de transcripción de gran importancia en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células durante la etapa embrionaria (Abu-Berada *et al.*, 2010), y dicha expresión se mantiene estable aun después de 50 duplicaciones celulares en esas clones. Las células aisladas por Zeng *et al.* (2006) mostraron capacidad de diferenciarse a una amplia gama de linajes celulares: adipocitos, condrocitos e osteocitos, células musculares lisas, células endoteliales, hepatocitos y células del neuroeje central.

Ovinos y caprinos

En caprinos, Quinavalla *et al.* (2002) observaron la capacidad de diferenciación osteogénica y osteogénica de células de la MO. Además, Estumaciad *et al.* (2007, 2009) evaluaron la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTM de MO de ovinos y caprinos. Ellos encuentran que las células aisladas de ambas especies tienen capacidad osteogénica, adipogénica y condrogénica, mientras que el tiempo de duplicación celular fue 21.94±2.67 h para caprinos y 24.9 h para ovinos.

Según McCarty *et al.* (2009), la abundancia de CTM con muestra obtenidas de ovinos adultos fue 4.6±0.7 células por cada 10⁶ células mononucleares, que expresan los marcadores de CTM: CD44, CD165 y CD29 y poseen capacidad osteogénica, condrogénica y adipogénica y carecen de la expresión de los marcadores Stro-1, CD146, CD93, y CD103 de CTM, y CD34, CD31 y CD45 de CE.

Bovinos

En bovinos, Gallecci *et al.* (2005) demostraron que las células aisladas se pueden duplicar 50 veces, las CTM aisladas tienen capacidad osteogénica, mientras que cultivos aislados con 10⁶ células aisladas mostraron capacidad adipogénica (presencia de gotas lipídicas) y osteogénica (expresión de cadena pesada de miostatina). Según Bernabeovic *et al.* (2005), las CTM de bovinos poseen capacidad osteogénica,

Zeng *et al.* (2006) showed the ability to differentiate into a broad spectrum of cell lineages: adipocytes, chondrocytes, osteocytes, smooth muscle cells, endothelial cells, hepatocytes, and neuroectoderm cells.

Goats and sheep

In goats, Quinavalla *et al.* (2002) observed the ability of bone marrow cells for chondrogenic and osteogenic differentiation. Also, Estumaciad *et al.* (2007, 2009) evaluated the capacity for proliferation and differentiation of bone marrow MSC from sheep and goats. They found that the isolated cells of both species have osteogenic, adipogenic and chondrogenic capacity. Cell duplication time was 21.94±2.67 h for goats and 24.9 h for sheep.

According to McCarty *et al.* (2009), the abundance of MSC in samples obtained from adult sheep was 4.6±0.7 cells for each 10⁶ mononuclear cells. These cells express the MSC markers CD44, CD165 and CD29 and have osteogenic, chondrogenic and adipogenic capacity; they lack expression of the MSC markers Stro-1, CD146, CD93, and CD103, and EC markers CD34, CD31, and CD45.

Bovines

In bovines, Gallecci *et al.* (2005) determined that isolated cells can duplicate 50 times. Isolated MSC had osteogenic capacity, while cultured cells treated with 5 α -dihydrocortisol exhibited adipogenic (presence of lipid droplets) and myogenic (expression of the heavy myosin chain) capacity. According to Bernabeovic *et al.* (2005), bovine MSC have osteogenic, chondrogenic, and adipogenic capacity as well as morphological characteristics particular to these linages. The cultured cells differentiated into osteocytes had cuboidal morphology; the cells treated with chondrogenic medium exhibited rounded morphology and an increase in cell density with multi layer formation, while the cells differentiated into adipocytes had lipid vacuoles.

Poultry

Studies in native and feralized mainly on chickens, Khari *et al.* (2005) characterized MSC isolated from bone marrow and, using PCR, found the expression

convergencia y adherencia, además de características morfológicas particulares de estos tejidos. Los cultivos diferenciados a osteocitos tenían una morfología cuboidal, las células tratadas con medio osteogénico mostraron morfología redondeada y un aumento en la densidad celular con formación de multicapas, y las células diferenciadas a adipocitos tenían morfología lipídica.

Aves

Los estudios son escasos y sencillos principalmente en pollos. Khari *et al.* (2009) caracterizaron CTM aisladas de MO de pollo y mediante PCR encontraron la expresión de los marcadores de superficie CD95, CD90, CD135 y de los factores de transcripción PaxV (homólogo a Olf4 de mamíferos), Sox2 y Nanog que controla el desarrollo y diferenciación de las CTM. Estos investigadores indujeron la diferenciación a las líneas adiposa, cartilaginosa y ósea.

Estos estudios muestran la diferenciación parcial de las CTM de MO de diferentes especies. En consecuencia, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) sugiere los criterios mínimos para las células aisladas: 1) capacidad de adherencia al plástico, 2) expresión de marcadores de superficie y 3) potencial de diferenciación a adipocitos, osteocitos y condrocitos (Dominko *et al.*, 2006).

Respecto a la capacidad de adherencia y potencial de diferenciación, todas las especies domésticas estudiadas comparten estas características con los modelos de aves (gallina y codorniz) y humano. Sin embargo, respecto a la expresión de marcadores los datos obtenidos de especies perнатitas son inconclusos. La ISCT sugiere que las CTM deben expresar por lo menos los marcadores CD95, CD90 y CD73, pero en especies perнатitas sólo se reportan algunos de estos marcadores y otros no asociados a las CTM.

En contraste, Rosenthal *et al.* (2010) con un panel de 45 anticuerpos probados en mono, caprino, ovino, porcino y canino determinaron que todos ellos reaccionan positivamente a los anticuerpos CD37, W8B2, W4A5, CD56, W3C4 (CD349), W3C4 y 5B31, pero McCarty *et al.* (2009) no encuentran expresión de CD90 y CD135 en ovinos. En estos experimentos se usaron anticuerpos diseñados para reaccionar a las antigénas de humano o rodentia, lo cual puede explicar la falta de marcadores en otras especies. Es necesario diseñar anticuerpos específicos para cada

de especies (ovino, CD90, CD105) and the transcription factors PaxV. Homologous to the mammal Olf4, Sox2 and Nanog, which control the development and differentiation of MSC. These markers induced differentiation to adipose, cartilage and bone lineages.

The studies report partial characterization of bone marrow MSC from different species. In this sense, the International Society of Cell Therapy (ISCT) suggests the minimum criteria for isolated cells: 1) capacity to adhere to plastic, 2) expression of identity markers, and 3) potential to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes (Dominko *et al.*, 2006).

Regarding the capacity to adhere and potential to differentiate, all of the domestic species studied share these characteristics with rodent (rat and mice) and human models. However, the data obtained from livestock species relative to the expression of markers are inconclusive. The ISCT suggests that MSC must at least express the CD95, CD90, and CD73 markers. But in livestock species, only some of these markers, as well as others associated with MSC, have been reported.

In contrast, Rosenthal *et al.* (2010) with a panel of 45 antibodies tested in monkey, goat, sheep, pig and dog, determined that all these species reacted positively to the antibodies CD37, W8B2, W4A5 (CD349), W3C4, and 5B31, but McCarty *et al.* (2009) did not find expression of CD90 or CD105 in sheep. In these experiments antibodies designed to react to human and rodent antigens were used; this can explain the lack of reactivity in other species. It is necessary to design specific antibodies for each species, as well as to characterize more comprehensively the different markers associated with MSC to determine the patterns of expression of the species studied. Expression of transcription factors Olf4, Sox2 and Nanog indicates multipotency in isolated cells and its characterization should be determined in these species since it would allow better identification of bone marrow MSC. This has been accomplished in poultry (Khari *et al.*, 2009) and horses (Violini *et al.*, 2005), but it is still pending in other domestic species.

Bone marrow MSC applications in veterinary medicine and animal production

Knowledge generated by MSC studies in domestic species relative to the ability to proliferate

especies así como una caracterización más completa de la expresión de factores marcadores asociados a las CTM para determinar los patrones de expresión de las especies estudiadas. La expresión de factores de transcripción (Oct3/4, Nanog o Sox2) indica multipotencialidad en las células aisladas y es una característica que se debe determinar en estas especies porque permitiría una mejor identificación de las CTM de MO. Esta se ha demostrado en aves (Khanji *et al.*, 2009) y cerdos (Vidali *et al.*, 2009), pero está pendiente en otras especies pecuarias.

Aplicaciones de las CTM de MO en medicina veterinaria y zootecnia

La información generada en los estudios de las CTM de las especies domésticas respecto a su capacidad de proliferación y diferenciación, abre posibilidades para el tratamiento de traumatismos, enfermedades inflamatorias y crónicas degenerativas, la generación de animales más eficientes o resistentes a enfermedades, una mayor comprensión del desarrollo y diferenciación de los tejidos musculares y adiposos, así como la conservación y potenciación de especies diversas y raras de especies domésticas en peligro de extinción.

Tempérmica

Las principales aplicaciones de estas células en el área veterinaria son el tratamiento de lesiones del aparato locomotor, en particular en los tejidos ósea, cartilaginosa y tendinosa en equinos y caninos. En los equinos las CTM de MO se usan para el tratamiento de lesiones ocasionadas por traumas o sobrecarga: tendinitis, lesiones en ligamentos, fracturas, luxaciones y enfermedades articulares (Smith *et al.*, 2009; Borjesson y Peroni, 2011). *In vitro* se ha comprobado su capacidad de diferenciarse a los tejidos ósea, cartilaginosa, adiposa y tendinosa (Vidali *et al.*, 2009; Ferry *et al.*, 2006). *In vivo* se aplican en modelos experimentales de tendinitis (Cawston *et al.*, 2010) y en estudios clínicos los resultados son favorables (Smith, 2008), se reporta reincidencia de 15 % en lesiones del tendón flexor digital superficial después de un año de seguimiento (n=108), comparado con 56 % de reincidencia para animales que siguieron el programa de rehabilitación controla para este tipo de lesiones.

and derivatives opens up possibilities for treatment of traumatic and inflammatory and chronic degenerative diseases, to generate animals more efficient or more resistant to diseases, a better understanding of the development and differentiation of muscle and adipose tissue, as well as conservation and preservation of endangered wild and breeds of domestic species.

Therapeutic uses

The main applications of these cells in veterinary medicine are the treatment of locomotor system injuries, particularly bone, cartilage and tendon tissue in horses and dogs. In horses, bone marrow MSC are used in the treatment of lesions caused during racing or jumping, tendon injuries, ligament lesions, fractures, luxations and arthralgic diseases (Smith *et al.*, 2009; Borjesson and Peroni, 2011). *In vitro*, their capacity to differentiate into bone, cartilage, adipose and tendon lineage has been demonstrated (Vidali *et al.*, 2009; Ferry *et al.*, 2006). These cells are used *in vivo* in experimental models of tendinitis (Cawston *et al.*, 2010) and in clinical studies results are favorable (Smith, 2008) report an 18 % recurrence in lesions of the superficial digital flexor tendon after one year of follow-up (n=108), compared with 56 % recurrence in animals that followed the conventional rehabilitation program for this type of lesion.

In dogs there are studies on the use of bone marrow MSC and adipogenic stem cell derived cells in osteoarthritis in elbow and carpalometacarpal articulation (Black *et al.*, 2007, 2008). In the first study, 16 dogs of different breeds were treated with MSC from adipose tissue applied to the elbow. The six month follow up of the resolution of their lameness showed an improvement of 54±4.7 %.

Besides these therapeutic application with mesenchymal cells, and given that pets suffer diseases similar to those of humans, their use in treatment of diabetes, cardiovascular diseases (Mingell *et al.*, 2006), lesions in the spinal cord (Cuby, 2010), immunological diseases, skin and muscular lesions (El Mazarawy *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2010) and chronic renal disease (Quinby *et al.*, 2011) has been investigated. Research on therapeutic use of MSC in pets and horses is scarce, but the results are positive. As with the characterization of MSC, it is necessary to develop and use specific models

En caninos hay estudios sobre el uso de CTM de MC y tejido adiposo en casos clínicos de osteoartritis del codo y de la articulación coxofemoral (Black *et al.*, 2007, 2008). En el primer estudio se trataron 14 perros de diferentes razas con CTM de tejido adiposo en la articulación del codo. Un requerimiento de seis meses de la evolución de la discapacidad para desplazarse mostró una mejora de 34 ± 4,7 %.

Además de sus aplicaciones de la terapia con células mesenquimales y dado que los modelos de compañías pueden entenderse similares a los del ser humano, se investiga su uso en cánceres cardiomiopáticos (Vingold *et al.*, 2010), cánceres en modelo equino (Cliby, 2010), enfermedades inmunológicas, lesiones en piel y mucosas (El-Metwally *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2010) y infeccional viral cutánea (Ziminy *et al.*, 2011). Las investigaciones sobre el uso terapéutico de las CTM en animales de compañía y equinos es escasa pero son resultados son positivos. Al igual que en la caracterización de las CTM, se requiere desarrollar y usar modelos específicos para desarrollar las estrategias adecuadas del uso de CTM en la medicina veterinaria.

Producción pecuaria

Desarrollo y metabolismo de músculo y tejido adiposo

Hayse conocen los mecanismos básicos del desarrollo de imbrastitidos en modelos murinos e humanos (Buckingham *et al.*, 2003; Chang y Rudnicki, 2004; Rosen y MacDougall, 2006). Los estudios del desarrollo y diferenciación de células musculares y adiposas en especies pecuarias se enfocan principalmente a sus precursores celulares inmediatos, las células satélite y los preadipocitos (Hannigan *et al.*, 2009; Dodson *et al.*, 2010) o bien al desarrollo y expresión génica de estos tejidos durante el período fetal (David *et al.*, 2011) y postnatal (Boppla-Melik *et al.*, 2011).

El estudio *in vitro* de la capacidad de diferenciación de CTM provenientes de especies pecuarias hacia células musculares y adiposas permite conocer los mecanismos y factores implicados en el desarrollo de esos tejidos, usando como modelo celular multipotentes como las CTM que se encuentran en un estado indiferenciado y no comprometidas a un linaje celular definido como es el caso de las células satélite y los preadipocitos.

to create appropriate strategies for their use in veterinary medicine.

Livestock production

Development and metabolism of muscle and adipose tissue

To date, the basic mechanism of development of these two tissues in murine and human models is known (Buckingham *et al.*, 2003; Chang and Rudnicki, 2004; Rosen and MacDougall, 2006). Studies on development and differentiation of muscle and adipose cells in livestock species are focused mainly on their immediate cell precursors, satellite cells and preadipocytes (Hannigan *et al.*, 2009; Dodson *et al.*, 2010) or on the development and gene expression of these tissues during the fetal (David *et al.*, 2011) and postnatal (Boppla-Melik *et al.*, 2011) periods.

In vitro studies of MSC from livestock species to establish their capacity of differentiation into muscle and adipose cells will lead to knowledge of the mechanisms and factors implicated in the development of these tissues using multipotent cells such as MSC found in an undifferentiated state and not committed to a defined cell lineage, as is the case of satellite cells and preadipocytes.

Knowledge of the events that lead to differentiation into muscle or adipose in MSC will support the development of techniques and components to manipulate differentiation into these tissues from early developmental stages or to stimulate differentiation of satellite cells present in tissues. The use of MSC as a model of adipogenesis and myogenesis will permit evaluation of non-nutritional components (phytochemicals) in animal diets and synthetic substances such as fibrous and muscle relaxants (Niseno *et al.*, 2007; Nave *et al.*, 2006) that can modify metabolism and gene expression of these tissues and, therefore, production response.

Reproduction, nuclear transfer, recombination, DNA technologies and transgenesis

Nuclear transfer (removal of the nucleus from an oocyte) and its substitution by a nucleus from a somatic cell is a technique that requires a source of donor cells, an adequate source of oocytes and receiving females to carry out gestation (Friedligh

El transgénisis es de los eventos que conducen a la diferenciación muscular y adiposa en la CTM por acción de células dadoras y compuestos para manipular la diferenciación de estos tejidos desde etapas tempranas del desarrollo, o estimular la diferenciación de células existentes presentes en los tejidos. El uso de la CTM como modelo de adipogénesis y miogénesis permitirá la evaluación de compuestos en nutrición (Estruquinos) de las dietas de los animales y de sustancias sintéticas, como los fitoquímicos y las taxolindoninas (Nóbrega *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009) que pueden modificar el metabolismo y expresión génica de estos tejidos y por tanto la respuesta productiva.

Reproducción, transferencia nuclear, tecnologías de ADN recombinante y transgénico

La transferencia nuclear (translocación del núcleo de un óvulo) y su sustitución por el núcleo de una célula somática es una técnica que replica una fuente de células dadoras, una fuente de óvulos receptores y también receptores para llevar a cabo la gestación (Todoroglu *et al.*, 2006). Esta técnica se puede usar para preservar especies en peligro de extinción como el lobo (Chen *et al.*, 2008) o el bueque chino (William *et al.*, 2008). En las especies domésticas puede utilizarse para clonar animales genéticamente superiores, resistentes con poblaciones nuevas (Jiang *et al.*, 2009) y masivas (Vanderwal *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011).

Las técnicas de ADN recombinante y transgénico permiten la introducción de genes foráneos al genoma del organismo, y resulta en la expresión de caracteres deseables como resistencia a enfermedades, aumento de productor farmacéuticos o la sobreexpresión de genes que modifiquen positivamente la producción (mejor conversión alimenticia, rápido crecimiento, producción de proteínas específicas o la leche) (Alamed y Khosa, 2010).

La utilización de las CTM en las técnicas de transferencia nuclear aprovechando sus características de proliferación y no estado diferenciado, permitirá obtener una gran cantidad de células donadoras de núcleo para transferencia nuclear que su uso en técnicas de ADN recombinante y transgénico permitirá emplear las técnicas de transferencia nuclear para generar animales transgénicos. Por ejemplo, pollos transgénicos que expresen proteína

oval, 2006). This technique can be used to preserve endangered species such as the wolf (Chen *et al.*, 2008) or mountain sheep (William *et al.*, 2008). In domestic species, it can be used to clone genetically superior animals or to rescue breeds with small populations (Jiang *et al.*, 2009) and pigs (Vanderwal *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011).

Recombinant DNA technology and transgenesis allow to introduce foreign genes into the genome of an organism, resulting in expression of desired traits such as resistance to disease, synthesis of pharmaceutical products or overexpression of genes that modify production positively (better feed conversion, fast growth, production of specific proteins, etc) (Alamed and Khosa, 2010).

The use of MSC in nuclear transfer techniques, taking advantage of their characteristics of proliferation and their undifferentiated state, would allow to obtain a large number of nucleus donor cells for transfer, while their use in DNA recombinant techniques and transgenesis would allow to employ in the techniques of nuclear transference in order to generate transgenic animals. An example is transgenic broiler that express Green Fluorescent Protein (eGFP) obtained from crossing parent that received directly in the zygotes, some mature MSC transfected with eGFP that differentiated into germinal cells capable of producing spermatozoa. Later, with semen obtained from those animals, several hens were artificially inseminated. From this cross, about 2100 chicks (a total of 30%) were obtained from four broilers with eGFP semen (Jiao *et al.*, 2011). Even though production efficiency of this type of animal is low, the means to produce them are now available. Improvement of the necessary techniques (using MSC as donor cells) in the near future will allow their use for the generation of animals with desirable characteristics.

In vitro meat production

In vitro meat production has been proposed as an alternative to reduce risks and costs of industrial meat production: avoid of diseases, environmental pollution, human competition for food and production efficiency, as well as to improve animal well-being (Langston *et al.*, 2010). The development of this technology will allow the production of meat equivalent with a specific composition for the needs

venta fluorescente (Green Fluorescent Protein, eGFP) a partir de la línea de células a las que se transplantaron directamente a los tejidos CTM de MO manipulados con eGFP y que se diferenciaron a células germinales capaces de producir espermatozoides. Después, con semen obtenido de estos animales se inseminó artificialmente a primas normales y de estas crías se crió un lote con eGFP de un total de 30%, a partir de cuatro machos con semen eGFP (Hoo *et al.*, 2011). La existencia para producir este tipo de animales es baja, pero ya hay métodos para generarlos. El perfeccionamiento de las técnicas necesarias (uso de CTM como células donadoras), permitiría en un futuro cercano, a su vez, generar animales con características deseadas.

Producción de carne *in vitro*

La producción de carne *in vitro* se ha propuesto como una alternativa para reducir los riesgos y costos de la producción industrial de carne de una animal, disminución de enfermedades, contaminación ambiental, competencia por alimentos con el hombre y eficiencia de la producción (Langham *et al.*, 2010). El desarrollo de esta tecnología permitiría la producción de carne derivada con una composición específica para las necesidades y preferencias del consumidor (mediante manipulación de ADN recombinante y transgénesis), disminuir el número de animales, el tiempo de producción y el riesgo de enfermedades de origen alimentario; además, producirá carne en espacios menores a los utilizados por la producción industrial de animales (Bhar y Payne, 2011). Pero aún están en desarrollo los métodos y tecnologías necesarios para su implantación, como obtener células adecuadas para el cultivo continuo y la estandarización de las condiciones ambientales para el crecimiento y diferenciación de las células cultivadas (Mironov *et al.*, 2009; Langham *et al.*, 2010).

El modelo ideal para esta tecnología en las células musculares esatomiadas (CTE), sin embargo las células líneas celulares de este tipo provienen de roedores y primates. En el caso de animales para producción de carne no hay líneas celulares bien establecidas (Telugu *et al.*, 2010). No obstante, Fredal *et al.* (2010) reportó la obtención de líneas de CTE en cerdos. Además, el uso de células musculares pluripotenciales inducidas (Induced Multipotent Stem Cells, iPSC) es una alternativa, pero la generación de estas células

and preferences of the consumer (using recombinant DNA and transgenic technology), reduce the number of animals, production time and risk of disease from food and this can be done in spaces smaller than those now used for industrial animal production (Bhar and Payne, 2011). But the methods and technologies required for implementation are still in process of development, such as to obtain cell suitable for continuous culture is needed, as well as standardization of environmental conditions for growth and differentiation of the cells used (Mironov *et al.*, 2009; Langham *et al.*, 2010).

The ideal model for this technology is embryonic stem cells (ESC); however, the only available cell lines of this type are those from rodents and primates. In the case of animals for meat production, there are no well-established cell lines (Telugu *et al.*, 2010). Nevertheless, Fredal *et al.* (2010) report obtaining ESC lines from pigs. Furthermore, the use of induced pluripotent stem cells (iPSC) is another alternative, but the generation of these cells from somatic cells implies the transfection of the transcription factors Oct4, Sox2 and those factors related to mouse Klf4 and c-Myc (Takahata, 2006) to recover pluripotency. Transfection with these factors is done one at a time, and this the technique is risky and slow. Because of this, for studies in this new technology, muscle cells from non-rodents are used, to avoid the drawback of a reduced number of cell duplications (Langham *et al.*, 2010). In this case, the use of bone marrow MSC offers an interesting alternative: in the continuing development of this technology since they have a greater capacity for duplication than satellite cells now used and a greater capacity for differentiation into several cell lineages.

CONCLUSIONS

Use and application of MSC is important in animal production and veterinary medicine due to their undifferentiated state, their high proliferative capacity and their capacity to differentiate into diverse cell lineages. In cell therapy they can be used in the treatment of lesions to the locomotor system, kidney failure, myocardial infarction or lesions to the spinal cord. Moreover, they are a useful model for research into the mechanisms that control differentiation and metabolism of muscle and adipose tissue, as well as in the development and study of new drugs or

de las células madre totipotentes requiere la transferencia de los factores de transcripción Oct4, Sox 2 y de los factores relacionados a factores 3G3 y c-Myc (Takahashi, 2008) para recuperar la pluripotencialidad. La transfección con estos factores se realiza una a la vez, por lo cual la técnica es riesgosa y lenta. Por ello, para los estudios de esta nueva tecnología se usan células con las prevenciones del tejido conectivo, cuya desventaja es un número reducido de duplicaciones celulares (Langelier *et al.*, 2010). En este caso, el uso de CTM de MO ofrece una alternativa interesante para continuar el desarrollo de esta tecnología, porque posee una mayor capacidad de duplicación que las células con tejidos conectivos, así como la capacidad de diferenciación para dar origen a diferentes líneas celulares.

CONCLUSIONES

El uso y aplicación de las CTM es importante en producción animal y medicina veterinaria debido a su estado indiferenciado, alta capacidad proliferativa y capacidad de diferenciación a diferentes líneas celulares. En la terapia celular se pueden usar en el tratamiento de lesiones de aparato locomotor, inflamatorias, reumáticas, infecciosas o lesiones de la médula espinal. Asimismo son un modelo útil para investigar los mecanismos que controlan la diferenciación y el metabolismo de las células madre y así mismo, así como en el desarrollo y estudio de nuevas fármacos o sustancias naturales. En técnicas de reproducción y transgénesis permitirá obtener de una muestra una gran cantidad de células para transferencia nuclear, clonación y generación de animales transgénicos.

En la producción de carne se usa el uso de las CTM de MO es una de las mejores opciones debido a sus características de proliferación y multipotencialidad en comparación con las células satélites. Estas células están limitadas por su baja capacidad de proliferación, lo cual obliga a un aporte constante y en mayor frecuencia de nuevas células satélites para sustituir a las células que han detenido su proliferación.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Proyecto PAPIIT D1209300 (UNAM, México) y es parte de la tesis doctoral

natural in vitro. Techniques of reproduction and transgenesis will permit obtaining a large number of cells from a sample for nuclear transfer, cloning, and generation of transgenic animals.

For in vitro meat production, the use of bone marrow MSC is one of the best options due to their proliferative and multipotency characteristics as compared with satellite cells. These cells are limited by their low capacity of proliferation, making it necessary to have a constant more frequent supply of new satellite cells to substitute cells that have ceased to proliferate.

—Prof. Dr. Ángel Sánchez—



(UNAM) de los dos últimos autores, los cuales participaron de igual forma en su realización. Amberlyngdena a CONACYT la cual otorga en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlan, UNAM, México.

LITERATURA CITADA

Alta Rosales, M., A. Cervera, M. Ferrag, C. Muñoz, E. Albaladejo, S. Pijoan, M. Lora, A. Gilmore, and T. Bergman. 2010. Can CD133 regulate stem cell differentiation and the outcome of remodeling? *Wound Repair and Regeneration*, 18(10): 1279-1286-1248.

Almeida, S., and A. N. Klotz. 2010. An introduction to DNA methylation and its role in stem cell pluripotency. *Stem Cells Int.*, 20: 591-596.

Bla, Z. T., and T. Caporaso. 2010. Perspectives of animal models in advancing nutraceuticals. *Food Sci. Technol.* 48: 413-416.

Bickel, L. L., J. Gaynor, B. Gearing, C. Adams, B. Acott, S. Harrison, D. Gargiulo, and R. Herman. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection on bone in lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the acetabulum. *J. Orthop. Res.* 25: 282-284.

Bickel, L. L., J. Gaynor, C. Adams, S. Obara, A. E. Sims, B. Taylor, S. Harrison, D. A. Gargiulo, and R. Herman. 2008. Effect of intramuscular injection of adipogenic mesenchymal stem cells on osteoarthritis of the hip. *Orthopedics*, 31(10): 192-201.

Boydell, T. J., M. T. Ryan, S. Selvar, D. F. Gannon, and A. J. Clayton. 2010. *Adipogenic and mesenchymal stem cell efficiency factors*. J. Effluentation. London, UK: 7-11.

Bozziro, S. J., and J. J. Boyce. 2011. The regenerative microenvironment: defining stem cell therapy for equine disease. *Clin. Lab. Med.* 3: 103-123.

Burrows, C. M., M. H. G. Kim, S. J. Jeong, M. Okamoto, and T. Fujimura. 2009. Isolation and identification

1. Formation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 340: 263-274.

Berant, T. A., L. G. Jaramba, L. Anantia, A. Virelli, B. Caspari, and B. Gumbart. 2006. Dlx5 overexpression and signaling networks promoting the multipotency of stem cells from parietal endoderm and mesoderm. *Development* 133: 485-495.

Eickling, M., M. L. Baur, T. Clang, J. Duda, J. Eickhorn, S. Meier, S. Mitter, D. Brumby, and T. Fuchs. 2003. The formation of embryonic stem cells in vitro. *J. Anim. Sci.* 207: 56-65.

Chang, S., and M. A. Jandack. 2004. Cellular mechanisms regulate the muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84: 233-238.

Gale, C. D., M. A. McManus, F. P. and M. S. Collins. 2007. Clonal lineage, ontogeny, and adhesion of adult mesenchymal stem cells: a histological, morphological and cytochemical study. *Development* 134: 507-520.

Colbert, S., G. Donath, T. Lagana, E. Ducei, C. G. Li, and G. Lian. 2005. Establishment, differentiation, development, and maintenance and functional analysis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7: 54-71.

Crovet, A., L. LaFiquera, G. Kohn, and E. Frances. 2006. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mesenchymal cells in collagen-induced arthritis of experimental allergic rheumatoid arthritis. *Am. J. Med. Sci.* 321: 400-409.

Datta, R., S. Singh, V. Rao, L. V. and M. E. Pao. 2011. Expression profile of functional genes in periodontal mesenchymal stem cells and progenitor cells. *Asian J. Dent. Genet.* 12: 15-27.

Dobson, M., V. G. J. Harrison, J. Chan, M. Du, T. Y. Kamnitsas, S. D. Paul, P. M. W. G. Berger, M. E. Preissner, C. C. Mitchell, P. P. Bhattacharya, J. M. Ruy, S. S. Vignani, and Z. Jiang. 2011. Mesenchymal stem cells from stroma I. Bone morphology. *Am. J. Cell. Sci.* 6: 465-474.

Dortman, M., K. LeBlanc, I. Madley, T. Slaves-Graham, E. Mendel, D. Knaus, S. Demko, A. Seating, D. J. Peadar, and E. Lewis. 2003. Marrow-derived fibrocyte and progenitor mesenchymal stem cells: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 5: 315-317.

El-Mekawy, H., E. A. Ali, M. T. Ali, H. M. Ali, N. S. Bahady, L. A. Rashid, and D. Fahy D. 2010. The role of stem cells in osteoblast differentiation and bone formation induced on stem cells in vivo. *Pract. Med.* 53: 281-289.

Falgairef, M. P., F. Taki, T. Nakano, I. Tadjiri, and M. T. Dancsak. 2007. Differentiation potential and stem expression of mesenchymal stem cells from ovine bone marrow: An immunological approach. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2: 55-65.

Efendić, M. E., M. Jafaric, A. Šljepčević, P. M. Albon, M. M. Džigan, and S. Huseinović. 2008. A new bone formation by stem mesenchymal stem cells cultured on a special biodegradable and porous ceramic matrix. *Arch. Med. Res.* 1: 10: 275-281.

Efendić, M. E., M. N. Nikolic, E. Filipić, L. Tighjan, and M. T. Dancsak. 2009. In vitro expansion and differentiation of mesenchymal stem cells from goat bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 11: 70-79.

Giachelli, C., A. Virelli, C. Panzavolta, M. Balmain, E. Scudellari, and A. Pizzoni. 2011. Experimental models for studying cell therapies. *Thrombolysis* 75: 140-145.

Gu, M. N., W. N. Ren, and J. J. Jiang. 2011. GDF-15 and C-MYC. *Mechanisms of the proliferation of adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. Med. Ther.* 11: 118-120.

Harrison, G. L., M. R. Johnson, K. Johnson, M. Asari, R. M. Barnes, J. L. Guan, Z. Jiang, S. P. Yang, R. D. Klein, S. Smith, M. Spelsberg, J. A. Avramis, M. L. Longobardi, and W. G. Berger. 2009. Bone, not just the biology and regulation of preosteocytes in bone tissue. *J. Anim. Sci.* 109: 10-19.

Hsu, Y. L., S. H. Lee, J. E. Yang, T. Kim, and H. T. Lee. 2011. Bone marrow cell-derived production of osteogenic clusters. *Lab Invest* Apr 25 [Epub ahead of print].

Jiang, S. D., E. L. Lu, X. Y. Xu, X. H. Liu, X. X. Zhao, B. Z. Zhao, J. Wang, D. J. Gong, Y. Y. and Z. Y. Xu. 2008. The potential of angiogenic-compensating mesenchymal stem cells from adult adipocytes for the treatment of postischemic of cerebral ischemia. *J. Theor. Comput. Sci.* 131: 422-455.

Jiang, G., S. Jiang, J. Song, J. Pak, H. G. C. Pao, J. He, E. Kim, M. Kim, and S. Lee. 2005. Generation of the adipose CD133⁺ fraction as a stem cell niche: maintenance, multipotential cell under culture. *J. Am. Med. Soc.* 297: 1127-1130.

Jiang, G., J. He, D. T. Kang, J. W. Xie, F. S. Qiu, J. C. Lee, E. L. Woo, and H. S. Park. 2005. A comparison of adipogenic and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation to osteogenesis in injury. *J. Neuro. Sci.* 225: 67-72.

Jiang, Y., F. Yoshizaki, T. Mori, T. Terai, M. Takiguchi, M. Uchida, M. Matsuura, A. Uemura, and Y. Terachi. 2006. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental multipotency of clone-specific stem cells from an adult animal. *Dev. Reprod.* 7: 415-418.

Klein, M., J. D. O'Brien, and J. M. Shalhoub. 2009. Isolation and differentiation of endogenous mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev* 19: 55-69.

Kuo, J. S., R. H. Guo, S. H. Guo, Y. S. Ren, C. T. Guo, T. L. Kim, Y. J. Song, Y. H. J. C. Rhyu, C. B. Chang, and Y. M. Lee. 2010. Transcriptional factors of endogenous mesenchymal stem cells on adipogenic and osteogenic potentials from parodontal cells. *J. Periodontol. Englan. Sci.* 41: 565-570.

Langsdorf, M. L., J. K. J. M. Basciani, S. S. Pata, F. R. E. Barrows, M. J. Tom, and D. W. J. Wade-Shick. 2011. MicroRNA expression in mesenchymal stem cells. *Methods* 54: 264-271.

Liang, Y., X. He, S. Takagi, and M. Okamura. 2011. Characterization of the mesenchymal stem cells and their adipogenic potential: chemokines results in increased chondrogenic differentiation of the stem cells. *Int. J. Mol. Res.* 12: 34-41.

Li, H., S. Yan, L. Li, Y. Li, and Y. Xue. 2009. Application of bone marrow progenitor cell from mouse model by cell stem

cell-to-cell communication in dogs. *Cells Tissues Organs* 190:34–41.

Lu, X., X. Li, Y. Fan, G. Zhang, D. Li, W. Dong, Z. Hu, X. Gu, Q. Song, F. Guo, and F. Wang. 2006. Upregulation of alpha 2(I) type I collagen during scaffold cultured skin reconstruction. *Stem Cells J Biol Med Mater Res (Appl Biomater)* 94:44–52.

Martin, D. B., N. R. Goswami, T. L. Hutchison, G. E. Nemeroff, and M. J. Baker. 2003. Kinetics and characterization of endogenous mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Exp Hematol* 31:877–886.

McCarthy, A. C., S. G. Stetler, A. C. Zimmerman, B. R. Jones, and C. L. Kane. 2009. Characterization and developmental potential of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 7:294–305.

Mingos, D. P., J. L. M. Clemente, M. A. Ramirez, E. L. Mackinnon, and G. P. Leach. 2010. In vivo characterization of a conditioned bone marrow derived stem cell in dogs. *Exp Clin Cardiol* 15:17–24.

Miyama, Y., T. Tani, Y. Kajiyama, S. Tani, R. Sato, and E. Mukoyama. 2009. Identification of a novel canine constitutively proliferating T cell. *Int J Hematol* 1:220–231.

Nakano, S., Y. Iwata, H. Matsuda, E. Taniuchi, S. Yano, T. Ishi, K. Ezaki, K. Haseki, K. Katsuragi, Y. Yamazaki, N. Saitoh, and K. Nakao. 2007. Endocrine regulation of the expansion and regenerative activity of Th17 lymphocytes and differentiation type 1 in murine bone marrow. *PLoS One* 2:e2134–2142.

Oh, H. J., M. K. Kim, G. Jang, H. J. Kim, S. G. Hong, J. E. Park, E. Park, S. H. Sohn, D. Y. Kim, K. S. Shin, and R. C. Lee. 2008. Clonal expansion of pericytes (alpha 2(I) type I collagen cells) cultured postnatally. *Thrombolytic* 22:635–640.

Oh, H. J., J. E. Park, M. Y. Kim, S. G. Hong, J. C. Ba, Y. Y. Jo, S. K. Kang, G. Jang, and E. C. Lee. 2011. Reduced gap junctional communication of alpha 2(I) collagen cells. *Thrombolytic* 25:422–429.

Ohs, N. 2011. The pathogenesis and treatment of osteoarthritis and ligament injury. *Am J Clin Sports Med* 39:801–807.

Ortiz, J., D. Song, J. H. Ohlert, J. Hsu, J. Joseph, E. Ueno, J. Edrington, E. Edwards, M. Guo, R. Sun, M. Dworkin, S. Gill, and A. Nataraj. 2009. Comparison of progenitor and multipotent mesenchymal stromal cells from adult bone marrow cells in a preclinical animal growth plate cartilage model. *J Orthop Res* 27:295–302.

Quarley, J. T., J. Webb, D. S. Gibbons, and N. W. Daw. 2011. Migration of bone marrow stromal cells into articular joints. *J Orthop Res* 29:1677–1684.

Quarley, J. T., S. Ghosh, J. Yin, B. Escobedo, G. Perez, V. Hasek, M. K. Egle, E. M. Kwon, S. O'Brien, and T. C. Meece. 2010. Bone marrow stromal cell-derived stem cells (BMDSCs) maintain multipotential potential and can be directed following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 31:101–109.

Rhodes, N. B., and J. K. Stamenkovic. 2014. Molecular and cellular analysis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in bone scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 25:2575–2585.

Rupik-Malk, E., R. Eder, and K. Döcker. 2011. The expansion pattern of mesenchymal regulatory factors (MRFs, MRFs and MRFs) in postnatal skeletal tissues. *Gene Expr Patterns* 11:79–83.

Russ, T. D., and D. A. MacDougall. 2002. Adipocyte differentiation in the marrow. *Dev Biol* 244:404–410.

Rosecrance, E., M. J. Taylor, A. Nataraj, J. Sval, F. J. Young, and A. L. Martin. 2010. Progressive isolation of mesenchymal stem cells from multiple nonadipogenic canine dog mesenchymal stromal cell (MSC) isolates. *Stem Cells Dev* 19:191–197.

Sato, K., T. Yamamoto, H. Ishi, M. Tanimoto, T. Kamada, and Y. Akiba. 2009. Role of pericytes in proliferation of bone marrow stromal cells in canine osteogenesis. *Comp Biochem Physiol Mol Toxicol Pharmacol* 154:370–377.

Seale, J. G., E. J. Gruber, W. A. Huntington, G. Sorochan, J. Nguyen, M. Richmond, M. E. Sturgis, and R. J. Martin. 2002. Mesenchymal stem cell populations in a bone marrow-derived mesenchymal progenitor and functional stem cell. *Transf Sci* 76:109–116.

Sera, H., M. S. Thirumangalakudi, A. Asadi, A. L. Sosa, B. J. Martin, D. Vila, S. C. Coulter, T. Liu, J. Ober, W. K. Vaughan, E. M. Briscoe, E. M. Oliveira, R. He, Y. J. Geig, J. T. Williamson, and E. L. Stein. 2013. Mesenchymal stem cells (MSCs) are bone marrow-derived postnatal mesenchymal progenitor cells and improve bone healing in a rat femoral bone union model. *Stem Cells Int* 2013:212.

Smith, R. K., M. Rioski, C. W. Ham, and A. E. Goodship. 2008. Role and implications of endogenous progenitor cell populations in bone marrow in a preclinical digital bone union rat model. *Stem Cells* 26:155–163.

Smith, R. K. 2008. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Equine Rehabil* 20:175–178.

Suzuki, K., and S. Yamazaki. 2006. Isolation of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures. *Cell and Tissue Res* 306:121–126.

Tachibana, A., T. Guo, and A. G. Arciniegas. 2008. Incomplete cortical cell nuclear transfer and preliminary data for bone marrow-derived CNT-5 cells. *Cell Res* 18:377–382.

Talbot, P. M., L. T. Eash, and R. M. Baker. 2003. The promise of stem cell research in pig and other ungulate species. *Nov Cell Rev* 1:31–40.

Wainwright, D. S., G. Wood, J. P. Ross, D. Shikha, D. C. Siller, D. E. Teeman, and K. L. White. 2006. Equine cloning: applications and concerns. *Reprod Fert* 10:11–16–17.

Vidal, M., G. Kasper, J. Johnson, M. Lopez, E. Mason, and J. Gault. 2008. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: oligogenic and osteogenic response. *Virchows Arch* 35:50–56.

Vicenzi-Alfonso, Wainwright, D., J. U. Hooper, M. Wainwright, S. Wainwright, T. Le Boucq, O. Telen, S. Jann, E. Yin, S. J. E. M. Mason, C. Doucet, A. Fain, and S. J. Jale. 2012. Is this xenogeneic modification of a donor-injected valve and bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSC) a good idea? *Transf Clin Res* 36:483–492.

2575–2585.

Rupik-Malk, E., R. Eder, and K. Döcker. 2011. The expansion pattern of mesenchymal regulatory factors (MRFs, MRFs and MRFs) in postnatal skeletal tissues. *Gene Expr Patterns* 11:79–83.

Russ, T. D., and D. A. MacDougall. 2002. Adipocyte differentiation in the marrow. *Dev Biol* 244:404–410.

Rosecrance, E., M. J. Taylor, A. Nataraj, J. Sval, F. J. Young, and A. L. Martin. 2010. Progressive isolation of mesenchymal stem cells from multiple nonadipogenic canine dog mesenchymal stromal cell (MSC) isolates. *Stem Cells Dev* 19:191–197.

Sato, K., T. Yamamoto, H. Ishi, M. Tanimoto, T. Kamada, and Y. Akiba. 2009. Role of pericytes in proliferation of bone marrow stromal cells in canine osteogenesis. *Comp Biochem Physiol Mol Toxicol Pharmacol* 154:370–377.

Seale, J. G., E. J. Gruber, W. A. Huntington, G. Sorochan, J. Nguyen, M. Richmond, M. E. Sturgis, and R. J. Martin. 2002. Mesenchymal stem cell populations in a bone marrow-derived mesenchymal progenitor and functional stem cell. *Transf Sci* 76:109–116.

Sera, H., M. S. Thirumangalakudi, A. Asadi, A. L. Sosa, B. J. Martin, D. Vila, S. C. Coulter, T. Liu, J. Ober, W. K. Vaughan, E. M. Briscoe, E. M. Oliveira, R. He, Y. J. Geig, J. T. Williamson, and E. L. Stein. 2013. Mesenchymal stem cells (MSCs) are bone marrow-derived postnatal mesenchymal progenitor cells and improve bone healing in a rat femoral bone union model. *Stem Cells Int* 2013:212.

Smith, R. K., M. Rioski, C. W. Ham, and A. E. Goodship. 2008. Role and implications of endogenous progenitor cell populations in bone marrow in a preclinical digital bone union rat model. *Stem Cells* 26:155–163.

Smith, R. K. 2008. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Equine Rehabil* 20:175–178.

Suzuki, K., and S. Yamazaki. 2006. Isolation of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures. *Cell and Tissue Res* 306:121–126.

Tachibana, A., T. Guo, and A. G. Arciniegas. 2008. Incomplete cortical cell nuclear transfer and preliminary data for bone marrow-derived CNT-5 cells. *Cell Res* 18:377–382.

Talbot, P. M., L. T. Eash, and R. M. Baker. 2003. The promise of stem cell research in pig and other ungulate species. *Nov Cell Rev* 1:31–40.

Wainwright, D. S., G. Wood, J. P. Ross, D. Shikha, D. C. Siller, D. E. Teeman, and K. L. White. 2006. Equine cloning: applications and concerns. *Reprod Fert* 10:11–16–17.

Vidal, M., G. Kasper, J. Johnson, M. Lopez, E. Mason, and J. Gault. 2008. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: oligogenic and osteogenic response. *Virchows Arch* 35:50–56.

Vicenzi-Alfonso, Wainwright, D., J. U. Hooper, M. Wainwright, S. Wainwright, T. Le Boucq, O. Telen, S. Jann, E. Yin, S. J. E. M. Mason, C. Doucet, A. Fain, and S. J. Jale. 2012. Is this xenogeneic modification of a donor-injected valve and bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSC) a good idea? *Transf Clin Res* 36:483–492.

- Yehliu, S., P. Bianchi, L. P. Wang, C. Gao, and P. Mader. 2015. Effects of molybdenum-methylalumina on cell expansion, embryonic cell number and skin thickness for scapular chondrocytes by *in vitro* exposure to BMP-9. *VMC: Cell Biol.* 10: 25.
- Wyllie, I. R., T. Shiu, F. Li, G. H. S. Chan, A. S. B. Gomes, A. S. Barthelemy, D. Strain, M. E. Williams. 2006. Contingency of endogenous signals for higher sleep. *Methods Mol. Biol.* 96: 155-167.
- Zeng, J., S. Mahony, Q. He, L. and J. S. Costa, M. P. Hsu, C. D. O'Boon, J. Zhang, and C. Verfaellie. 2016. Molybdenum adjuvants regulate cell function in bone marrow. *Bone Cells* 14(7): 973-985.
- Zhu, H. B., D. Z. Guo, S. J. Yang, Y. H. Zhang, H. Wang, F. Li, G. C. G. Cheng, and C. C. Cheng. 2015. The effects of Cu of the organic growth promoters on bone tissue molybdenum-methylalumina in cattle. *Veterinary Medicine* 111: 504-509.

2. HIPÓTESIS

El uso de compuestos que favorezcan la actividad y expresión de PPARs incrementará la diferenciación adiposa y muscular de células mesenquimales de bovino.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto de compuestos agonistas de PPAR, naturales o sintéticos, sobre el desarrollo, diferenciación y metabolismo energético de células mesenquimales obtenidas de médula ósea de bovino diferenciadas hacia los linajes muscular y adiposo.

3.2 Objetivos Específicos.

- 1) Establecer cultivos primarios de células troncales mesenquimales (multipotenciales) obtenidos de médula ósea de bovinos.
- 2) Estandarizar un sistema de cultivo-diferenciación de células multipotenciales hacia los linajes muscular y adiposo.
- 3) Conocer los cambios en la expresión de diferentes factores de transcripción asociados a la diferenciación muscular o adiposa.
- 4) Manipular diferentes factores de transcripción usando agonistas (naturales o sintéticos) que permitan una mejor diferenciación de ambos tipos celulares así como conocer sus efectos en el metabolismo energético.

4. MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS.

Bovine (*Bos taurus*) bone marrow mesenchymal cells differentiation to adipogenic and myogenic lineages.

Jesús Jonathan Ramírez-Espinosa, Laura González-Dávalos, Armando Shimada, Enrique Piña, Alfredo Varela-Echavarría, y Ofelia Mora

Artículo aceptado para publicación en Cell Tissue Organs

De:
"a.lorenz@karger.com" <a.lorenz@karger.com>
Para: vlemora2001@yahoo.com.mx
CC: gj38w@ceservices.virginia.edu; medac@emory.edu; ofcmora36@unam.mx
Enviado: Lunes, 7 de septiembre, 2015 3:38:28
Asunto: C110-111513007

CELLS TISSUES ORGANS

Ms No.: 201503007

Title: Bovine (*Bos taurus*) bone marrow mesenchymal cells differentiation to adipogenic and myogenic lineages

Authors: Ramirez J., González-Dávila L., Shimada A., Pifia F., Varela-Echavama A., Mora O.

Dear Dr. Mora,

Thank you for submitting a revised version of your manuscript.

We are pleased to inform you that it has now been accepted for publication in our journal and forwarded to the Editing and Production Department at S. Karger AG Medical and Scientific Publishers who will be contacting you shortly. Please accept our congratulations. Fewer than 30% of all submitted papers to this journal are accepted for publication.

We hope you will continue to submit work from your group to CELLS TISSUES ORGANS in the future.

With kind regards,

George Christ
Associate Editor

Angela Lorenz
Editorial Office CELLS Tissues Organs
t +41 61 306 1358
f +41 61 306 14 34
a.lorenz@karger.com

S. Karger AG, Medical and Scientific Publishers, Allschwilstrasse 10, 4009
Basel, Switzerland
t +41 61 306 1111, f +41 61 306 1234, www.karger.com

Bovine (*Bos taurus*) bone marrow mesenchymal cells differentiation to adipogenic and myogenic lineages

J.J. Ramírez^a, L. González-Dávalos^b, A. Shimada^b, E. Piña^c, A. Varela-Echavarría^d and O. Mora^{b*}

^a Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

^b Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FES-Cuautitlán), UNAM, Querétaro, Qro., Mexico

^c Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

^d Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, Qro., Mexico

Bovine BMD-MC differentiation to adipogenic and myogenic lineages

J.J. Ramírez

Address: Blvd. Juriquilla 3001, Lab. A03, 76230 Querétaro, Qro.

Phone: +52 4422381032

Fax: +52 4422381038

E-Mail: jesus.j.ramirezmvz@gmail.com

L. González-Dávalos

Address: Blvd. Juriquilla 3001, Lab. A03, 76230 Querétaro, Qro.

Phone: +52 4422381032

Fax: +52 4422381038

* Dr. Ofelia Mora

Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional

Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro 76230, México

E-Mail ofemora66@unam.mx

E-Mail: lauragdavalos@yahoo.com.mx

A. Shimada

Address: Blvd. Juriquilla 3001, Lab. A03, 76230 Querétaro, Qro.

Phone: +52 4422381032

Fax: +52 4422381038

E-Mail: shimada@unam.mx

E. Piña

Address: Facultad de Medicina, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, 04510, Mexico City.

Phone: +52 555622-0829

Fax: +52 555616-2282

E-Mail: epgarza@unam.mx

A. Varela

Address: Blvd. Juriquilla 3001, Lab. A03, 76230 Querétaro, Qro.

Phone: +52 4422381032

Fax: +52 4422381038

E-Mail: avarela@unam.mx

O. Mora

Address: Blvd. Juriquilla 3001, Lab. A03, 76230 Querétaro, Qro.

Phone: +52 4422381032

Fax: +52 4422381038

E-Mail: ofemora66@unam.mx

Key Words: Cell differentiation PPAR Energy metabolism Bovine

Abstract

Purpose: We evaluated the effect of PPAR agonists on differentiation and metabolic features of bovine bone marrow mesenchymal cells induced to adipogenic or myogenic lineages. **Methods:** Cells isolated from 7-day-old calves, were cultured in basal medium (BM). For adipogenic differentiation (AD) cells were cultured for one passage in BM and then transferred to a medium supplemented with either rosiglitazone, telmisartan, sirtinol, or conjugated c-9, t-11 linoleic acid; for myogenic differentiation (MD), third-passage cells were added with either bezafibrate, telmisartan, or sirtinol. Expression of *PPAR γ* (AD marker), *MyHC* (MD marker), and genes related to energy metabolism were measured by qPCR in a completely randomized design. **Results:** For AD, 20 μ M telmisartan showed the highest *PPAR γ* expression (15.58 \pm 0.62 fold, $p < 0.0001$), and differences in expression of energy metabolism-related genes were found for hexokinase II, phosphofructokinase, adipose triglyceride lipase, acetyl-CoA carboxylase α (*ACAC α*), and fatty acid synthase ($p < 0.001$), but not for *ACAC β* ($p = 0.4275$). For MD, 200 μ M bezafibrate showed the highest *MyHC* expression (73.98 \pm 11.79 fold), and differences in the expression of all energy metabolism-related genes were found ($p < 0.05$). **Conclusions:** Adipocyte and myocyte differentiation are enhanced with telmisartan and bezafibrate, respectively; energy uptake, storage, and mobilization are improved with both.

Abbreviations used in this paper

ACAC α	acetyl-CoA carboxylase α
ACAC β	acetyl-CoA carboxylase β
AD	adipogenic differentiation
ADM	adipogenic differentiation medium
ATGL	adipose triglyceride lipase
BM	basal medium
BMD-MC	bone marrow-derived mesenchymal cells
CLA c-9, t-11	conjugated c-9, t-11 linoleic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
FABP4	fatty acid binding protein 4
FASN	fatty acid synthase
FBS	fetal bovine serum
HK2	hexokinase 2
HS	horse serum
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IM	induction medium
MD	myogenic differentiation
MDM	myogenic differentiation medium
MSC	mesenchymal stem cells
MyHC	myosin heavy chain
NCoR	nuclear receptor corepressor
PD	population doublings
PFK	Phosphofructokinase
PPAR's	peroxisome proliferator-activated receptors

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells isolated from tissues such as bone marrow; they are capable of proliferation for long periods, and can differentiate *in vitro* into several lineages such as adipocytes, chondrocytes, osteocytes, myocytes, or hepatocytes [Zeng et al., 2006]. These properties make them a useful model to study the development and differentiation of adipose and muscular tissues.

The current approach to determine cell differentiation includes the assessment of transcription factors and functional proteins of each lineage, as well as the detection of minerals, proteoglycans, or lipids [Eslaminejad et al., 2007]. However, metabolic characteristics of these cells have not been fully elucidated, so studying PPARs as metabolic sensors may provide a better understanding of their energetic state after differentiation and their relationship to development, differentiation, and metabolic regulation. PPARs take part in the control of energy homeostasis by regulating glucose metabolism and fatty acid mobilization, oxidation (PPAR α and PPAR β/δ), and synthesis (PPAR γ) [Ehrenborg et al., 2010].

Our aim was to determine the effect of a set of molecules that could enhance the differentiation and modulate the metabolic features of bovine (*Bos taurus*) bone marrow mesenchymal cells induced toward adipogenic or myogenic lineages by determining the mRNA expression of late differentiation markers (PPAR γ and *MyHC*) and genes related to energy homeostasis.

Material and methods

All procedures involving animals were approved by the Internal Committee for Use and Care of Experimental Animals (CICUAE-UNAM from its abbreviations in Spanish). Four male Holstein calves, less than 7 days old were used per experiment. Animals were euthanized by stunning with a captive bolt gun followed by exsanguination.

Two experiments were carried out: the first to measure proliferation capacity, assess mesenchymal stem cell markers, and induce differentiation into adipogenic and myogenic lineages. The second assessed the ability of various compounds to enhance adipogenic and myogenic differentiation of bovine bone marrow-derived mesenchymal cells (BMD-MC) and measured changes in the expression of genes related to energy metabolism. Procedures for cell isolation, culture, passaging, and RNA extraction were similar in both experiments and are described first.

Cell isolation, culture, and passaging

Cell isolation was carried out with some modifications to the method used by Mahajan and Stahl [2009]. Bone marrow was harvested from humeri and femurs and taken to a bio-hazard hood where samples were dispersed by passage through 16-, 18- and 20-gauge needles with isolation medium [Dulbecco's modified Eagle's medium with glucose (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 U/ml penicillin-G, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)]. Dispersed bone marrow was washed by centrifugation at 450 x g for 5 min at room temperature, the supernatant was discarded, and the pellet formed was re-suspended in

isolation medium; this final step was repeated three times. After the last wash, the pellet was re-suspended in basal medium (BM) [DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics, and antimycotics as above] and plated on 10- or 3.5-cm diameter culture dishes (Corning Inc., Corning, NY, USA). Cultures were maintained at 37°C with 90% humidity and 5% CO₂. Non-adherent and hematopoietic cells were removed 24 h after plating by washing the culture dishes with PBS and completely changing the culture medium; media were changed every 3 d until confluence. At 70-80% confluence, cultures for cell expansion were passaged using 0.25% trypsin (Life Technologies), counted with a hemocytometer, and reseeded at 6.4×10^3 cells/cm² for plates of 10-cm diameter, and at 8.4×10^3 cells/cm² for plates of 3.5-cm diameter. Cultures from the initial isolation, and from passages 3, 5, 10 and 14, used for adipogenic and myogenic differentiation were treated with specific differentiation media when they reached 70-80% confluence.

RNA isolation

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The RNA concentration was assessed by absorbance at 260 nm and its purity by the 260 nm to 280 nm absorbance ratios with a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). The integrity of RNA samples was verified by agarose (1%) gel electrophoresis.

cDNA synthesis

Reverse transcription to cDNA was carried out using 2 µg of RNA and oligo dT₁₅ primer with Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies). To avoid genomic DNA

contamination, RNA samples were pre-treated with DNase I (Roche, Indianapolis, IN, USA) for 5 min at room temperature followed by incubation at 70° C for 5 min to inactivate DNase I.

Real time-PCR

Quantitative real time PCR (qPCR) was performed to analyze adipogenic and myogenic potential and energy metabolism of differentiated BMD-MC.

Specific primers for target genes were designed for a) adipogenic differentiation: *PPAR γ* ; b) myogenic differentiation: myosin heavy chain (*MyHC*); c) energy metabolism of differentiated adipose cells: hexokinase 2 (*HK2*), phosphofructokinase (*PFK*), adipose triglyceride lipase/desnutrin (*ATGL*), fatty acid synthase (*FASN*), acetyl-CoA carboxylase α (*ACAC α*) and *ACAC β* ; d) and energy metabolism of differentiated myocytes: *HK2*, *PFK*, *ACAC β* , fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), and *PPAR δ* (Table 1). PCR products were sequenced to verify primer-specific identity, and the presence of a single product of the predicted size was observed in a 1.5% agarose gel electrophoresis. The efficiency of each pair of primers was determined by standard curves generated from serial dilutions of pooled cDNA [Livak and Schmittgen, 2001].

Several housekeeping genes (Table 2) were tested for their suitability to estimate relative gene expression of target genes and analyzed using Excel's Add-ins Bestkeeper (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html> [Pfaffl et al., 2004]), Normfinder (MDL, Aarhus, Denmark [Andersen et al., 2004]), and GeNorm (Biogazelle, NV, Ghent, Belgium [Vandesompele et al., 2002]). The housekeeping genes selected were *RPL13a* and *YWHAZ* for adipogenic differentiation, and *YWHAZ* and *18S* for myogenic differentiation.

Samples were run in duplicate using a Light-Cycler 2.0 Instrument and Light-cycler Fast-Start DNA Master Sybr Green I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Data were normalized to the geometric mean of the housekeeping genes, and changes in gene expression were calculated by the $X^{-\Delta\Delta Ct}$ method [Schmittgen and Livak, 2008]. Relative mRNA levels are expressed as fold change relative to control samples that produce an $X^{-\Delta\Delta Ct}$ value of 1.

Experiment 1

Proliferation capacity. The self-renewal capacity of the isolated cells was assessed by calculating the population doublings (PD). Cells isolated from bone marrow were seeded in triplicate on 3.5-cm diameter culture dishes in BM; at 70-80% confluence, cells were passaged, counted, and reseeded as passage 1 at 8.4×10^3 cell/cm². Cells from passages 1 to 15 were maintained with a fixed sub-culturing time of 5 days, counted, and reseeded (8.4×10^3 cell/cm² at each passage). Data from cell counts were used to estimate population doublings and to construct a cumulative PD plot using the formula:

$$PD = \frac{\ln(N_f/N_s)}{\ln 2},$$

where PD is the number of population doublings, ln is the natural logarithm, N_f is the number of cells harvested at subculture, and N_s is the number of cells initially seeded [Freshney, 2005].

To plot a proliferation curve with the cumulative total cell number along passages, the formula used was [Xiao et al., 2010]:

$$\text{Total cell number of } P_n = \text{number counted at } P_n \times \left(\frac{\text{number counted at } P_{n-1}}{\text{total number of cells seeded}} \right)$$

Expression of MSC markers. Cultures used as initial controls were analyzed for the expression of lineage markers. When isolated cells reached 70-80% confluence, total RNA was extracted, and cDNA was synthesized. Expression of lineage markers was assessed by conventional PCR with specific primers for MSC surface markers CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105, the hematopoietic cell surface markers CD34 and CD45, as well as stem cell marker ABCG2 (Table 3).

Adipogenic differentiation. Cell cultures from isolation and passages 3, 5, 10, and 14, were used to assess adipogenic capacity; cultures were seeded at 8.4×10^3 cells/cm² and kept in BM. At 70-80% confluence, BM was replaced with adipogenic differentiation medium (ADM); total RNA from cultures used as initial control was extracted at this time point, and cultures designated as final control were maintained with BM until the end of the treatment.

For AD, cells were treated with induction medium (IM) [DMEM supplemented with 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Life Technologies), 0.25 μ M dexamethasone, 2.5 μ g/ml insulin (both from Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin and 0.25 μ g/ml amphotericin)]. After 24 h, IM was replaced with differentiation medium (ADM) composed of DMEM supplemented with 5% FBS, 2.5 μ g/ml insulin, antibiotics and antimycotic. Cultures were treated for 28 d with complete media changes every 3 d; at the end of the treatment total RNA was extracted from cultures treated with ADM and from cultures maintained with BM, and cDNA was synthesized for further qPCR analysis of the differentiation marker *PPAR γ* (Table 1) at various passages. *PPAR γ* mRNA expression was assessed with the $X^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and cultures kept in BM were used as controls for data normalization.

Myogenic differentiation. Three different media were tested in confluent cultures:

a) DMEM supplemented with 5% horse serum (HS) (Life Technologies), 0.1 μ M dexamethasone, 50 μ M hydrocortisone (Janssen Cilag, Mexico City, Mexico), antibiotics, and antimycotic [Gang et al., 2004];

b) DMEM supplemented with 10% FBS, 10 μ M 5-azacytidine, antibiotics, and antimycotic [Drost et al., 2009] for 24 h, and the same medium without 5-azacytidine for the rest of the treatment period.

c) DMEM supplemented with 2% FBS, 10 μ M 5-azacytidine, antibiotics, and antimycotic for 24 h, and the same medium without 5-azacytidine for the rest of the treatment period.

To assess differentiation, PCR was performed with oligonucleotides for myogenic factors and markers [*Pax3*, *Pax7*, *Myogenin*, *MEF2C*, *MRF4*, *MyoDI*, *Myostatin*, *Myf 5*, Myosin Heavy Chain (*MyHC*), and *Desmin*] (Table 4). Total RNA was extracted from cultures from days 1 to 8 and from weeks 2 to 4. cDNA was synthesized, and PCR was performed for myogenic factors *Pax7*, *Myogenin*, and *MRF4* for each of the three media at each time point. After selecting a specific medium, PCR was performed for *Pax3*, *MEF2C*, *MRF4*, *MyoDI*, *Myostatin*, *Myf5*, *MyHC*, and *desmin*.

Myogenic differentiation was induced using cell cultures from freshly isolated cells and passages 3, 5, 10, and 14. At 70-80% confluence, cell cultures were maintained in myogenic differentiation media for 28 d with complete media changes every 3 d. At the end of the treatment, total RNA was extracted from cultures with myogenic medium and from control cultures maintained with BM; cDNA was synthesized for qPCR analysis of *MyHC*. To estimate the *MyHC* mRNA expression level with the $X^{-\Delta\Delta Ct}$ method, cultures kept in BM until the end of the 28-d treatment period were used as controls for data normalization.

Experiment 2

After establishing the optimal time point (passage) for BMD-MC differentiation into adipocytes or myocytes (Exp. 1), we next tested compounds that could enhance differentiation into these lineages. Cells were isolated, maintained, and passaged as described; freshly isolated cell cultures were used for adipogenic differentiation, and cells from the third passage were used for myogenic differentiation. Triplicate cultures were treated with a specific compound and dose when cells reached 70-80% confluence; unless otherwise stated, treatment continued for 28 d, until the end of the experimental period.

Adipogenic differentiation. Compounds and doses tested in cultures for adipogenic differentiation were: rosiglitazone (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA) 1, 10, 20 μM ; telmisartan (Sigma-Aldrich) 1, 10, 20 μM ; conjugated c-9, t-11 linoleic acid (CLA c-9, t-11) (Sigma-Aldrich) 10, 50, 100 μM ; and sirtinol (Sigma-Aldrich) 10, 25, 50 μM . Cell cultures were treated for 10 d with complete media changes every 3 d, except for sirtinol, which was applied only during the first 24 h of the differentiation treatment. Control cultures treated with BM, differentiation medium, and differentiation medium plus vehicle [0.1% ethanol or 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO)] were included.

Myogenic differentiation. Compounds and dosages tested in cultures for myogenic differentiation were: bezafibrate (Sigma-Aldrich) 50, 100, 200 μM ; telmisartan 1, 10, 20 μM ; and sirtinol 10, 25, 50 μM (only during the first 24 h). Cell cultures were treated for 28 d with complete media changes every 3 d. Control cultures for myogenic differentiation included: BM, differentiation medium, and differentiation medium plus vehicle (0.5% DMSO).

At the end of the treatment period (10 or 28 d) total RNA was extracted, cDNA synthesized, and qPCR analysis for adipogenic (*PPAR γ*) and myogenic differentiation (*MyHC*) were performed. Changes in mRNA expression of genes related to energy metabolism were analyzed for the treatments that resulted in the greatest increase of adipogenic or myogenic differentiation. To estimate mRNA expression level with the $X^{-\Delta\Delta C_t}$ method, for adipogenic (*PPAR γ*) or myogenic differentiation (*MyHC*) as well as for energy metabolism-related genes, cultures treated with differentiation media plus vehicle were used as control samples for data normalization.

Statistical Analysis

The proliferation capacity of BMD-MC was assessed by regression analysis using data obtained from population doublings and the total number of cells. The general linear model procedure (GLM) from SAS [2008] was used for data analysis. Least square means \pm SEM were computed and used to analyze differences between treatments. Differentiation potentials toward adipogenic and myogenic lineages in Exp. 1 data were analyzed as a completely randomized design with a 5 x 3 factorial arrangement (passage and treatment media). For Exp. 2, data were analyzed as a completely randomized design with 17 treatments for adipogenic differentiation and 13 treatments for myogenic differentiation.

Results

Experiment 1

Proliferation capacity. At the end of the experimental period, isolated cells had undergone an estimated 16.44 PD ($y = 0.79 + 1.25x - 0.014x^2$) and reached a total number of 7.45×10^6 cells ($y = 514,007 + 863,004x - 26700x^2$) (Fig. 1). First derivatives were calculated for both regression equations to determine the theoretical value at which PD and cell number stop increasing. Calculated values were: 28.69 PD at passage 45 (44.64) and 7.48×10^6 total cells at passage 16 (16.16).

Expression of MSC Markers. Conventional PCR for MSC markers showed that bovine BMD-MC express MSC markers *CD 29*, *CD44*, *CD73*, *CD90* and *CD105*; stem cell marker *ABCG2*; but do not express or show a very low expression of the hematopoietic stem cell markers *CD 34* and *CD45* (Fig. 2).

Adipogenic differentiation. Expression of *PPAR γ* in cell cultures of BMD-MC treated with ADM was confirmed with conventional PCR, and the product was characterized by agarose gel electrophoresis, sequenced, and compared with sequences reported in the NCBI database GenBank; matching sequences were: BC116098.1, NM181024.2, Y12419.1, and AY179866.1.

qPCR for *PPAR γ* showed that freshly isolated cultures treated with differentiation media had the highest *PPAR γ* expression (10.69 ± 1.1 fold, $p \leq 0.0233$) of all passages and treatments (Fig. 3a). Among passages freshly isolated cell cultures also showed the highest expression of *PPAR γ* (5.72 ± 0.98 fold), which was different from passages 3, 10, and 14 ($p \leq 0.021$) but not from expression levels observed in passage 5 (3.38 ± 1.01 fold, $p =$

0.0991). Overall, cell cultures from all passages treated with differentiation media showed a greater average expression level of *PPAR γ* (3.70 ± 0.49 fold) that was different ($p = 0.007$) from initial control cultures (1.00 ± 0.86 fold), but not from non-differentiated control cultures kept in BM (2.69 ± 0.87 fold).

Myogenic differentiation. Cells treated to promote myogenic differentiation did not expressed *Pax 7* in any of the three media used. Nevertheless, cell cultures treated with DMEM, 5% HS, dexamethasone, and hydrocortisone expressed *MRF4* after 1 day of treatment, and expression was maintained throughout the treatment period; however, cells cultured in the other 2 differentiation media showed no expression of this myogenic factor at any time (Fig. 4a). Cultures that expressed *MRF4* also showed expression of mRNA for *MEF2C*, *Myf5*, *MyHC* (Fig. 4b) *Pax3*, *Myogenin*, , *Myostatin* and *desmin*, but not *Myod1*(data not showed).

qPCR for *MyHC* in cultures treated with DMEM, 5% HS, dexamethasone, and hydrocortisone was performed to determine which passage displayed increased differentiation to myocytes. As shown in Fig. 3b, the highest expression of *MyHC* (201.85 ± 25.95 fold) was different from all other passages and treatments ($p \leq 0.0254$), and it occurred in cultures from passage 3 treated with myogenic differentiation medium. Cell cultures treated with myogenic medium also showed higher expression (88.80 ± 11.91 fold, $p \leq 0.0201$) than cell cultures used as initial controls (1.07 ± 20.10 fold) and non-differentiated control cultures kept in BM (34.07 ± 20.39 fold).

Experiment 2

Effect of PPAR agonists on adipogenic differentiation.

During exposure to experimental compounds, cultures isolated from bovine BMD-MC showed a heterogeneous performance among treatments and dosages; although the formation of vacuoles of several sizes was observed in all experimental treatments, in cultures with rosiglitazone (1, 10 and 20 μM), telmisartan (10 and 20 μM), and CLA c-9, t-11 (50 and 100 μM), cells developed a rounded morphology and larger vacuoles than cells from all other treatments, suggesting a complete adipocyte differentiation and formation of lipid droplets.

The relative expression of *PPAR γ* determined by qPCR confirmed that this adipogenic marker was differentially expressed in cultures subjected to the various treatments and dosages used. High expression of *PPAR γ* was observed in cultures treated with telmisartan, rosiglitazone, or CLA c-9, t-11 (Fig. 5a). Cultures treated with 20 μM telmisartan showed the highest expression of all treatments (15.58 ± 0.62 fold; $p < 0.0001$). Cultures treated with rosiglitazone at 20 μM , telmisartan at 10 μM , and CLA c-9, t-11 at 100 μM had similar levels of expression (6.94 ± 0.62 , 7.83 ± 0.62 and 7.62 ± 0.62 , respectively, $p \geq 0.3156$), but they were different from all other treatments ($p \leq 0.0140$). Rosiglitazone at 1 and 10 μM resulted in *PPAR γ* expression lower than the aforementioned but greater than the expression level found in controls (4.65 ± 0.62 and 4.42 ± 0.62 respectively, $p \leq 0.0102$). Sirtinol had no effect on expression of *PPAR γ* mRNA at any dose tested (Fig. 5a).

As 20 μM telmisartan evoked the highest expression of *PPAR γ* , mRNA expression levels for genes related to energy metabolism were assessed in cultures with 20 μM telmisartan and compared to levels found in cultures treated with ADM only. Differences in expression

levels were found for *HK2* (1.72 ± 0.09 fold, $p < 0.0001$); *PFK* (1.43 ± 0.09 fold, $p < 0.0027$); *ATGL* (29.87 ± 3.45 fold, $p < 0.0001$); *ACAC α* (5.44 ± 0.48 fold, $p < 0.0001$), and *FASN* (5.51 ± 0.31 fold, $p < 0.0001$), but not for *ACAC β* ($p = 0.4275$) (Fig. 5b). These results showed that in cultures grown in 20 μ M telmisartan, genes related to glycolysis (*HK2* and *PFK*), fatty acid mobilization (*ATGL*), and fatty acid synthesis (*ACAC α* and *FASN*) were up-regulated, while lipolysis (*ACAC β*) was unaffected, suggesting that adipocytes differentiated from cattle BMD-MC have a more efficient glucose metabolism which, besides supplying the cell's energy needs, could provide substrates for an increased rate of fatty acid synthesis and mobilization.

Effect of PPAR agonists on myogenic differentiation.

Morphological changes suggesting myocyte formation were not clearly observed in cells under any of the treatments for myogenic differentiation; however, the formation of circular-shaped cell colonies surrounded by very elongated cells (resembling myocytes) spreading from these colonies, or the formation of vacuoles could be detected. qPCR showed that the relative expression of *MyHC* was different among the treatments and doses used. Cultures treated with 200 μ M bezafibrate showed the highest *MyHC* expression (73.98 ± 11.79 fold), but it was similar to expression levels found with telmisartan at 10 μ M (52.58 ± 11.79 fold) and 20 μ M (48.22 ± 11.79 fold) ($p = 0.2008$ and $p = 0.1238$, respectively) (Fig. 6a). *MyHC* expression levels with bezafibrate at 50 μ M (42.36 ± 11.79 fold) or 100 μ M (36.71 ± 11.79 fold) and telmisartan at 10 μ M (52.58 ± 11.79 fold) or 20 μ M (48.23 ± 11.79 fold) were similar ($p \geq 0.0919$). Although *MyHC* expression increased slightly in cultures treated with sirtinol, these changes were not different from *MyHC* expression levels found in control cultures (Fig. 6a).

Metabolism-related gene expression was evaluated by qPCR in samples treated with myogenic differentiation media and samples treated with bezafibrate at 200 μ M, which showed the highest expression of *MyHC*. All genes tested (*HK2*, *PFK*, *ACAC β* , *PPAR δ* and *FABP*) were up-regulated (5.26 ± 0.86 fold, 1.77 ± 0.25 fold, 9.97 ± 1.23 fold, 1.88 ± 0.23 fold and 185.63 ± 23.93 fold, respectively) in cultures treated with 200 μ M bezafibrate relative to control samples (Fig. 6b).

Discussion

Some authors have shown that BMD-MC are highly proliferative and can reach 30 to 50 PD before they become senescent [Colleoni et al., 2005]. Our PD value of 28.7 is close to previously published data. In general, the PD and cumulative cell number values indicate that BMD-MC isolated from cattle possess a proliferation capacity similar to those observed in other species such as humans [Bonab et al., 2006], swine [Zeng et al., 2006], or horses [Vidal et al 2006]. Nonetheless, several factors influence the proliferative potential of these cells (individual variability, age of donor, media composition, or cell density); such factors were not studied in the present work, because our experimental conditions already provided bovine BMD-MC with a good proliferative capacity for the long-term culture and because of the large number of cells required.

Also the isolated cells showed expression of the several MSC surface markers tested and lack or have a very low expression of hematopoietic markers *CD34* and *CD45*. This is in accordance with previous results reported by Cardoso et al. [2012] and Cortes et al. [2013]

whom reported expression of *CD29*, *CD73*, *CD90* and *CD105* on MSC derived from bovine umbilical cord and the expression of *CD73*, *CD90* and *CD105* on MSC derived from bovine bone marrow respectively. Here, we also reported the expression of *CD44*, a surface marker found in MSC from several species as mouse [Gnecchi and Melo, 2009], human [Karaöz et al., 2011], swine [Zeng et al., 2006] and sheep [McCarty et al., 2009].

Along with their proliferative capacity, bovine BMD-MC had the potential to differentiate into several cell lineages; our results showed that they are able to differentiate into adipocytes and myocytes. In both cases, cell differentiation capacity was highest in early passages, and this ability decreased with further passaging. This is consistent with previous reports with human and mouse bone marrow. Kretlow et al. [2008] and Bonab et al. [2006] reported that proliferation, adhesion, and differentiation capacity of MSC are impaired by both increasing donor age and passage number.

Our results indicate that BMD-MC can differentiate into adipocytes, as shown by *PPAR γ* expression. Adipogenic differentiation was previously reported for bovine BMD-MC [Bosnakovski et al., 2005], swine [Colleoni et al., 2005], equine [Vidal et al 2006], ovine [Eslaminejad et al., 2007], and poultry [Khatri et al., 2009]. However, the optimal time (passage) to induce adipogenic differentiation of bovine BMD-MC had not been identified. Our results show that these cells have the highest potential for adipogenic differentiation at early passages, as previously reported for mice and humans.

Myogenic differentiation had been previously reported for cells isolated from bone marrow [Colleoni et al., 2005] and umbilical cord blood [Gang et al., 2004]. Our results show that a medium supplemented with HS, hydrocortisone, and dexamethasone can induce bovine BMD-MC to differentiate into myocytes, as demonstrated by their

expression of mRNA for *MyHC*, a terminal differentiation marker of muscle cells. Moreover, here we report that bovine MSC induced toward myogenic differentiation express myogenic factors: *Pax3*, *Myogenin*, *MRF4*, *Myf5*, *MEF2C*, and *myostatin* as well as the late differentiation markers *MyHC* and *desmin*, but they do not express mRNA for *Pax7* or *MyoD*.

MyoD is a transcription factor considered necessary to start the differentiation program of muscle cells at the “commitment” level, and it also can induce muscle differentiation in cells from other lineages such as fibroblasts or chondrocytes, while myogenin is considered necessary for the final differentiation of committed cells. On the other hand, MRF4 function has been more related to proliferation and late differentiation than to the determination of myogenic lineage, and Myf5 is related to commitment; it is known that these myogenic factors and myogenin can also induce muscle differentiation to a certain extent, and they can partially replace each other’s functions. In this context, Kassari-Duchossoy et al. [2004] showed in a murine double-null model for *MyoD* and *Myf5* that expression of *MRF4* is able to induce proliferation and differentiation of myoblasts. Schnapp et al. [2009] were able to partially rescue myogenesis by injecting *MRF4* mRNA in zebra-fish embryos in which MyoD and Myf5 translation were blocked, but not by injecting *myogenin* mRNA. Also, Xynos et al. [2010] found that hematopoietic stem cells can express *Myf5* and differentiate into myocytes without expressing *Pax7* and *MyoD*. Collectively, these data and our findings suggest that bovine BMD MC have, or could have, a different expression pattern in which *Myogenin*, *Myf5* and *MRF4* are sufficient to induce commitment and determination of these cells toward myogenic differentiation, whereas the presence of *MyoD* is not mandatory as previously reported in other species.

Differentiation improvement.

Effect on adipogenesis. After we identified basic conditions for AD and MD, we sought to speed up these differentiation processes. Given the interrelationship between PPARs, cell differentiation, and metabolic regulation, we tested a series of compounds for their ability to enhance adipogenic or myogenic differentiation by increasing the expression, activity, or both of PPARs. The selected compounds belong to different pharmacological families such as class III histone deacetylases inhibitors, thiazolidinediones, angiotensin II receptor antagonists; as well as natural ligands such as conjugated linoleic acid. Our aim on using such compounds on the differentiation of BMD MSC was to identify the more effective compounds under this *in vitro* conditions in order to select them for further investigation regarding the relevance and feasibility of its use on cattle to modulate the adipogenic and myogenic differentiation processes and hence the quality of the products obtained from those animals.

Sirt1 has been related to regulation of energy metabolism, since its up-regulation inhibits PPAR γ activity and expression [Picard et al., 2004]. Here, we hypothesized that this sirtuin inhibitor would enhance adipogenic and myogenic differentiation of bovine BMD MSC, but our results indicate that sirtinol had no effect on adipose or myogenic differentiation of the bovine BMD-MC. It is known that when PPAR γ is not binding with their ligands interacts with nuclear corepressors 1 or 2 (NCoR) and the complex formed avoid PPAR γ interaction with its target genes. On this sense, as reported by Picard et al (2004), SIRT1 also binds with to NCoR and thus directly or indirectly inhibits PPAR γ activity.

Moreover, it has been reported that the inhibition of SIRT1 activity by sirtinol or iRNA enhance expression and activity of adipogenic enzymes like ACC [Jiang et al., 2012]. Despite these previous reports, we didn't find a positive effect on the use of sirtinol during differentiation of our cells; this lack of response might be due in part to our differentiation protocol which is longer than other culture systems on which sirtinol had been used. Also, we added sirtinol only at the beginning of the differentiation protocol and assessed its effect at the end of this protocol, while on several other works this assessment occurs between 2 and 72 hours after the sirtinol treatment [Jiang et al., 2012; Toussirost et al., 2013].

CLA is a group of several fatty acids that can act as natural PPAR ligands; CLA c-9, t-11, and CLA c-10, t-12 are the isomers most commonly found in dairy and meat products, and they have been implicated in lipid metabolism regulation. In several models, CLA c-10, t-12 was found to inhibit expression of *PPAR γ* as well as proteins related to fatty acid anabolism and storage (carbonic anhydrase 3, CD36, GLUT4, GPDH) and adipogenesis (C/EBP α), while CLA c-9, t-11 enhanced adipocyte differentiation and lipogenesis by increasing expression of proteins such as *PPAR γ* , FASN, stearoyl CoA desaturase, GPDH, and FABP4 [Platt and El-Sohemy, 2009]. Our results show that adipose differentiation increases in culture medium supplemented with the CLA c-9, t-11 isomer, and that this increase is dose dependent (Fig. 5a). This is in accordance with previously reported data in rats [Zhou et al., 2007], humans [Platt and El-Sohemy, 2009], and swine [Zhou et al., 2008], where expression of *PPAR γ* and related genes increased.

We used rosiglitazone as a *PPAR γ* -specific ligand to test its adipogenic effect on bovine BMD-MC. Our results indicate that the compound enhanced adipose differentiation of cell cultures, as reported for murine [Shockley et al., 2009] and human [Ninomiya et al., 2010]

models. Interestingly, both CLA c-9, t-11 and rosiglitazone induced adipose differentiation to a similar extent at the highest dose tested, but rosiglitazone had a greater binding affinity for PPAR γ , as shown by the doses used here.

Telmisartan showed PPAR activation properties in several human clinical and experimental trials [He et al., 2010]. The compound has recently been recognized as a partial agonist of this nuclear receptor family, and its binding mechanism to PPAR γ has been elucidated [Amano et al., 2012]. We tested its ability to enhance adipogenic differentiation (through PPAR γ). Our results showed that telmisartan induces adipose differentiation of bovine BMD-MC to a greater extent than that found for rosiglitazone. Also, the level of *PPAR γ* expression increases in a dose-dependent manner. In this sense, the activation of a PPAR-responsive reporter gene construct on CV 1 cells has been reported with telmisartan concentrations ranging 5-20 μ M, as well as the partial adipogenesis of C3H10T 1/2 and 3T3 L1 at a dosage of 10 μ M (Erbe et al., 2006). Tagami et al. (2009) found that telmisartan 10 μ M induced at least 35% activation relative to that induced by troglitazone and pioglitazone in wild type TSA-201 cells, and this activity was retained in PPAR γ mutants, while troglitazone and pioglitazone activities were highly impaired.

Effect on myogenesis. As an acknowledged partial agonist to PPARs, we also tested Telmisartan's ability to induce myogenesis, to our knowledge this is the first report that this compound increases *MyHC* expression in cattle BMD-MC, and this effect may be due to its ability to activate either PPAR α or PPAR δ or both.

Bezafibrate is a synthetic pan-PPAR ligand. Through activation of PPAR α , and the transcription or silencing of its target genes, the main effects of bezafibrate are increased lipolysis, β -oxidation, and clearance of triglyceride-rich lipoproteins, and decreased *de novo* fatty acid synthesis [Goldenberg et al., 2008]. By activating PPAR δ , fatty acid oxidation, energy metabolism, and adaptative thermogenesis are enhanced [Tenenbaum and Fisman, 2012]. Here we found that among the compounds tested, bezafibrate induced the highest expression of *MyHC*. We hypothesize that the increased expression of *MyHC* mRNA by both bezafibrate and telmisartan is due to direct activation of PPAR α and PPAR δ , which modulates subsequent transcription of myogenic factors. In this context Gaudel et al. [2008] reported that treatment with GW0742, a PPAR δ agonist, led to a transient increase of myogenic factors MyoD1 and Myf5 in *tibialis anterior* muscles of mice. Moreover, Bonala et al. [2012] found that PPAR δ activation with the specific ligand L165041 increases proliferation of the muscle cell line C2C12 as well as its differentiation. They found increased expression of mRNA for the myogenic factor *MyoD1* and *Myogenin* and an increase of MyHC protein. Also, the Growth and differentiation factor associated serum protein-1 (Gasp 1) has a PPRE in its promoter region, identifying it as a target of PPAR δ . Gasp1 interacts with myostatin, inhibiting its signaling and thereby allowing the proliferation and differentiation of muscle cells.

Moreover, given that our results showed no expression of *Myod1*, but cells expressed MyHC (a terminal differentiation marker for muscle lineage) and several myogenic transcription factors involved in lineage determination and differentiation. We performed a search for putative transcription factors binding sites using the software tool for genome “*in silico*” analysis PROMO 3.0 [Messeguer et al., 2002; Farré et al., 2003] for either PPARs

and myogenic factors. Promoter region (3,000 bp upstream of the origin of transcription) of MyHC and myogenic factors analyzed possess several putative transcription factor binding sites for both, the myogenic factors expressed and PPARs (Table 5), and given that these myogenic factors can substitute each other roles as aforementioned this could explain that even though we didn't find Myod1 expression, cells undergone terminal differentiation and expressed MyHC.

Effects of PPAR agonists on energy metabolism.

After treating cells with several PPAR ligands to promote differentiation, we selected the treatment with the highest expression of *PPAR γ* or *MyHC* for adipogenic and myogenic differentiation, respectively, for further analysis to determine the energy metabolism status. Our results indicated that bovine BMD-MC differentiated into adipocytes and treated with telmisartan have a more efficient glucose metabolism that can fulfill the cell's energy needs and also supply substrates for the increased rate of fatty acid synthesis and mobilization. The increased *HK2* gene expression indicates a higher uptake of glucose available for glycolysis, and it has been reported that glucose also can up-regulate ACAC and FASN in adipose tissue [Foufelle et al., 1996]. In 3T3-L1 adipocytes, telmisartan increases expression and translocation of GLUT4 to the plasma membrane through *PPAR γ* [Furukawa et al., 2011], which can explain a higher glucose uptake by treated cells. PFK, a key enzyme in the glycolytic pathway, is also regulated by *PPAR γ* and increased levels of PFK can induce fat deposition in mice and in the 3T3-L1 cell line [Huo et al., 2012]. Our results showed an up-regulation of *PFK* expression in response to telmisartan treatment, but its relative expression was lower than that of *HK2*. This implies that, although glucose

uptake is increased, not all of the glucose enters the glycolytic pathway; instead, there can be a surplus that can be driven to alternate pathways such as the pentose phosphate synthesis pathway. Hence, during telmisartan treatment, glucose metabolism will generate both the energy (ATP) and substrates (acetyl CoA and NADPH) needed for *de novo* fatty acid synthesis. Regarding lipid metabolism of telmisartan-treated cells, we found an increase of *ACAC α* and *FASN*, key enzymes for *de novo* fatty acid synthesis; the first catalyzes the ATP-dependent carboxylation of acetyl-CoA forming malonyl-CoA, which is the substrate for *FASN*-catalyzed synthesis of palmitate. *ATGL* catalyzes the first and rate-limiting step for the complete hydrolysis of triglycerides, and its transcription may be up-regulated during adipose differentiation by *PPAR γ* and *FoxO1* [Lass et al., 2011]. This gene was also up-regulated during telmisartan treatment. *ACAC β* regulates fatty acid metabolism, whose end product malonyl-CoA is a potent inhibitor of carnitine palmitoyltransferase-1 (*CPT-1*), the enzyme responsible for the uptake of fatty acids into mitochondria. These effects on characteristics of lipid metabolism in bovine BMD-MC treated with telmisartan suggest that these cells have increased *de novo* fatty acid synthesis (*ACAC α* and *FASN*) and an increased rate of lipolysis (*ATGL*), while fatty acid oxidation remains unaffected. Possible implications of this outcome are that these cells have a more active energy metabolism, their glucose uptake and utilization is more efficient, and their fatty acid synthesis and mobilization are up-regulated.

For cells differentiated into myocytes and treated with bezafibrate, the increased expression of glycolytic (*HK2* and *PFK*), fatty acid transport (*FABP*), and fatty acid catabolic (*ACAC β*) enzymes, all of which are regulated by *PPAR δ* , also points to an enhanced energy metabolism. Taken together, the expression levels of these genes suggest

a rearrangement of several metabolic pathways involved in uptake, storage, and use of energetic substrates in bovine BMD-MC differentiated to myocytes and treated with bezafibrate. However, the greater change of *HK2* expression relative to that found for *PFK* indicates that, even with the increased glycolysis rate, a surplus of phosphorylated glucose could be generated, and this also can be driven to alternate pathways such as gluconeogenesis and pentose synthesis. The observed increase of *FABP* suggests an enhanced fatty acid uptake by the bezafibrate-treated cells, while the *PPAR δ* increase indicates that utilization of fatty acids for oxidation is higher than in controls. Nonetheless, *ACAC β* increased notably in bezafibrate-treated cultures. At first glance, this outcome seems to contradict the increases of *FABP* and *PPAR δ* expression (indicators of a higher fatty acid catabolism) given that, under normal conditions, *ACAC β* inhibits *CPT-1* and therefore fatty acid oxidation. However, the higher level of glycolysis in the treated cells can explain this outcome, because *ACAC α* and *ACAC β* are activated by citrate (a glycolytic metabolite) and therefore, the main result will be fatty acid synthesis in adipose tissue (via *ACAC α*) or inhibition of fatty acid oxidation in muscular tissue (via *ACAC β*).

Conclusions

Bovine BMD-MC can be induced to differentiate toward adipogenic and myogenic lineages most readily at early passages. In addition, PPAR ligands (telmisartan and bezafibrate) are possible tools for increasing cell differentiation, and they activate the energy metabolism of the differentiated cells.

Acknowledgements

JJ Ramírez thanks the National Council of Science and Technology from Mexico (CoNaCyT) for a scholarship at FESC-UNAM. The authors received a grant IN200910 from PAPIIT-UNAM. We thank the Proteogenomics Unit for its technical assistance and Dorothy Pless for revising the English manuscript (both from INB-UNAM).

References

- Amano, Y., T. Yamaguchi, K. Ohno, T. Niimi, M. Orita, H. Sakashita, M. Takeuchi (2012) Structural basis for telmisartan-mediated partial activation of PPAR gamma. *Hypertension Res* 35: 715-719.
- Andersen, C.L., J.L. Jensen, T.F. Ørntoft (2004) Normalization of Real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250.
- Bonab, M.M., K. Alimoghaddam, F. Talebian, S.H. Ghaffari, A. Ghavamzedah, B. Nikbin (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 7: 14.
- Bonala, S., S. Lokireddy, H. Arigela, S. Teng, W. Wahli, M. Sharma, C. McFarlane, R. Kambadur (2012) Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ induces myogenesis by modulating myostatin activity. *J Biol Chem* 287: 12935-12951.
- Bosnakovski, D., M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumura, T. Fujinaga (2005) Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319: 243-253.

Cardoso T.C., H.F. Ferrari, A.F. Garcia, J.B. Novais, C. Silva-Frade, M.C. Ferrarezi, A.L. Andrade, R. Gameiro (2012) Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnology* 12:18

Colleoni, S., G. Donofrio, I. Lagutina, R. Duchi, C. Galli, G. Lazzari (2005) Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7: 154-166.

Cortes Y., M. Ojeda, D. Araya, F. Dueñas, M.S. Fernández, O.A. Peralta (2013) Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Veterinary Research* 9:133

Domènec, F., R. Roset, M. Huerta, J. E. Adsuara, L. Roselló, M. M. Albà, X. Messeguer (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31: 3651-3653

Drost, A.C., S. Weng, G. Feil, J. Schäfer, S. Baumann, L. Kanz, K.D. Sievert, A. Stenzl, R. Möhle (2009) In vitro myogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for urethral sphincter muscle repair. *Ann N Y Acad Sci* 1176: 135-143.

Ehrenborg, E., A. Krook (2010) Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* 61: 373-393.

Erbe, D.V., K. Gartrell, Y. L. Zhang, V. Suri, S. J. Kirincich, S. Will, M. Perreault, S. Wang, J. F. Tobin (2006) Molecular activation of PPARgamma by angiotensin II type 1-receptor antagonists. *Vascul. Pharmacol.* 45:154-162

Eslaminejad, M.B., F. Falahi, H. Nazarian, L. Taghiyar, M.T. Daneshzadeh (2007) Differentiation potential and culture requirements of mesenchymal stem cells from ovine bone marrow for tissue regeneration applications. *Iranian Journal of Veterinary Surgery* 2: 53-65.

Freshney, R.I. (2005) *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.

Foufelle, F., J. Girard, P. Ferré (1996) Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms *Adv Enzyme Regul* 36: 199-226.

Furukawa, H., K. Mawatari, K. Koyama, S. Yasui, R. Morizumi, T. Shimohata, N. Harada, A. Takahashi, Y. Nakaya (2011) Telmisartan increases localization of glucose transporter 4 to the plasma membrane and increases glucose uptake via peroxisome proliferator-activated receptor γ in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 660: 485-491.

Gang, E.J., J.A. Jeong, S.H. Hong, S.H. Hwang, S.W. Kim, I.H. Yang, C. Ahn, H. Han, H. Kim (2004) Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 22: 617-624.

Gaudel, C., C. Schwartz, C. Giordano, N.A. Abumrad, P.A. Grimaldi (2008) Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol. Endocrinol Metab* 295: E297-E304.

Gnecchi, M., L. Melo (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. In:

Audet J., and W.L. Stanford (eds). *Stem Cells in Regenerative Medicine*. Humana Press New York, New York. USA, pp:281-294.

Goldenberg, I., M. Benderly, U. Gouldbort (2008) Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc Health Risk Manag* 4: 131-141.

He, H., D. Yang, L. Ma, Z. Luo, S. Ma, X. Feng, T. Cao, Z. Yan, D. Liu, M. Tepel, Z. Zhu (2010) Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ -dependent pathways. *Hypertension* 55: 869-879.

Huo, Y., X. Guo, X. Li, H. Xu, V. Halim, W. Zhang, H. Wang, Y.Y. Fan, K.T. Ong, S.L. Woo, R.S. Chapkin, D.G. Mashek, Y. Chen, H. Dong, F. Lu, L. Wei, C. Wu (2012) Targeted overexpression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in adipose tissue increase fat deposition but protects against diet induced insulin resistance and inflammatory responses. *J Biol Chem* 287: 21492-21500.

Jiang, S., A. Wang, J. Minner, M. Fromm (2012) Cross regulation of sirtuin 1, AMPK, and PPAR γ in conjugated linoleic acid treated adipocytes. *PLoS One* 7:e48874

Karaöz, E., A Okçu, G. Gacar, O. Sağlam, S. Yürüker, H. Kenar (2011) A comprehensive characterization study of human bone marrow mscs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. *J. Cell. Physiol.* 226: 1367-1382

Kassar-Duchossoy, L., B. Gayraud-Morel, D. Gomès, D. Rocancourt, M. Buckingham, V. Shinin, S. Tajbakhsh (2004) Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431: 466-471.

Khatri, M., T.D. O'Brien, J.M. Sharma (2009) Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev* 18: 1485-1492.

Kretlow, J.D., Y.Q. Jin, W. Liu, W.J. Zhang, T.H. Hong, G. Zhou, L.S. Baggett, A.G. Mikos, Y. Cao (2008) Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol* 9: 60.

Lass, A., R. Zimmermann, M. Oberer, R. Zechner (2011) Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 50: 14-27.

Livak, K.J., T.D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.

Mahajan, A., C.H. Stahl (2009) Dihydroxy-cholecalciferol stimulates adipocytic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. *J Nutr Biochem* 20: 512-520.

McCarty, R.C., S. Gronthos, A.C. Zannettino, B.K. Foster, C.J. Xian (2009) Characterization and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 2:324-333.

Messeguer, X., R. Escudero, D. Farré, O. Nuñez, J. Martínez, M. M. Albà (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18: 333-334

Ninomiya, Y., Y. Sugahara-Yamashita, Y. Nakachi, Y. Tokuzawa, Y. Okazaki, M. Nishiyama (2010) Development of rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 303-308.

Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515.

Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M.W. McBurney, L. Guarente (2004) Sirt 1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429: 771-776.

Platt, I.D., A. El-Sohemy (2009) Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem* 20: 956-964.

SAS Institute, (2008) SAS OnlineDoc. 9.1.3. Cary, NC, USA: SAS Institute, Inc.

Schmittgen, T.D., K.J. Livak (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.

Schnapp, E., A.S. Pistocchi, E. Karampetsos, E. Foglia, C.L. Lamia, F. Cottelli, G. Cossu (2009) Induced early expression of mrf4 but not myog rescues myogenesis in the myod/myf5 double-morphant zebrafish embryo. *J Cell Sci* 122: 481-488.

Shockley, K.R., O.P. Lazarenko, P.J. Czernik, C.J. Rosen, G.A. Churchill, B. Lecka-Czernik (2009) PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106: 232-246.

Tagami, T., H. Yamamoto, K. Moriyama, K. Sawai, T. Usui, A. Shimatsu, M. Naruse (2009). A selective peroxisome proliferator activated receptor-gamma modulator, telmisartan, binds to the receptor in a different fashion from thiazolidinediones. *Endocrinology*. 150: 862-870

Tenenbaum, A., E.Z. Fisman (2012) Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc Diabetol* 11: 140.

Toussiro, E., W. Abbas, K. A. Khan, M. Tissot, A. Jeudy, L. Baud, E. Bertolini, D. Wendling, G. Herbein (2013) Imbalance between HAT and HDAC activities in the PBMCs of patients with ankylosing spondylitis or rheumatoid arthritis and influence of HDAC inhibitors on TNF alpha production. *PLoS One* 8:e70939

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Patt, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric mean averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034

Vidal, M.A., G.E. Kilroy, J.R. Johnson, M.J. Lopez, R.M. Moore, J.M. Gimble (2006) Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Sur* 35: 601–610.

Xiao, Y., V. Peperzak, L. van Rijn, J. Borst, J.D. de Bruijn (2010) Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 4: 374-386.

Xynos, A., P. Corbella, N. Belmonte, R. Zini, R. Manfredini, G. Ferrari (2010) Bone marrow derived hematopoietic cells undergo myogenic differentiation following a Pax-7 independent pathway. *Stem Cells* 28: 965-963.

Zeng, L., E. Rahrmann, Q. Hu, T. Lund, L. Sanquist, M. Felten, T.D. O'Brien, J. Zhang, C. Verfaillie (2006) Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells* 24: 2355-2366.

Zhou, X., D. Li, J. Yin, J. Ni, B. Dong, J. Zhang, M. Du (2007) CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J Lipid Res* 48: 1701-1709.

Zhou, X.R., C.H. Sun, J.R. Liu, D. Zhao (2008) Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR gamma gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. *Growth Horm IGF Res* 18: 361-368.

Figure Legends

Fig.1 Cumulative cell doublings and cumulative total cell number of bovine BMD-MC, kept under a fixed subculturing time of 5 d over the course of 15 passages. Symbols (\circ , \square , \diamond , \triangle) indicate data acquired from individual animals ($n = 4$); continuous line displays the estimated values of the equation obtained from regression analysis ($p < 0.0001$) for cumulative cell number (a) and cumulative cell doublings (b) at each passage ($n = 4$).

Fig.2 Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR products from RT-PCR reactions from bone marrow-derived MSC from 2 animals. PCR products for mesenchymal stem cell markers CD44 (a); CD90 (b); CD29 (c); CD73 (d); CD105 (e); ABCG2 (f) and hematopoietic stem cell surface markers CD34 (g) and CD45 (h); negative control of PCR (no cDNA template) (i); and positive control of PCR (β -actin) (j) were added; MW 1k bp Molecular weight marker.

Fig.3 Relative expression of mRNA for *PPAR γ* and *MyHC* in bovine BMD-MC induced to differentiate, a) *PPAR γ* expression in cells from freshly isolated cultures and at passages 3, 5, 10, and 14. b) Expression of myosin heavy chain (*MyHC*) in cells obtained at isolation and passages 3, 5, 10 and 14. IC = Initial control (RNA extracted at confluence). NDF = no differentiation control (maintained in basal media); ADM = adipogenic differentiation medium, and MDM = myogenic differentiation medium. Results are expressed as least square means \pm SEM ($n = 4$). a, b, c used to identify significant differences.

Fig.4 Agarose gel electrophoresis (1.5%) of PCR products from cattle bone marrow-derived MSC under myogenic differentiation. a) Expression of myogenic factor MRF4 mRNA along different time points of myogenic differentiation and treated with three

differentiation media; a to i: day 0 to day 8 of treatment; j to l: week 2 to 4 of treatment; m positive control (cDNA from cattle muscle); n: β actin (PCR control). b) Expression of MEF2C, Myf5 and MyHC mRNA in cattle bone marrow-derived MSC during myogenic differentiation; a to i: day 0 to day 8 of treatment; j to l: week 2 to 4 of treatment; m: no cDNA template (PCR reaction negative control); n: β actin (PCR reaction positive control). MW: 100 bp molecular weight marker.

Fig.5 a) Expression of *PPAR γ* in bovine BMD-MC treated to enhance adipogenic differentiation. ADM = adipogenic differentiation medium; IC = initial control (RNA extracted at confluence); NDF = no differentiation control (cell cultures maintained in basal media); DMSO = ADM + 0.5% dimethyl sulfoxide; ethanol = ADM + 0.1% ethanol; Sirt = ADM + sirtinol (10, 25, or 50 μ M); CLA = ADM + conjugated c-9, t-11 linoleic acid (10, 50, or 100 μ M); Tel = ADM + telmisartan (1, 10, or 20 μ M); Ros = ADM + rosiglitazone (1, 10, or 20 μ M). Data are expressed as least square means \pm SEM (n = 4). Different letters indicate significant differences between columns ($p \leq 0.05$). b) Expression level of energy metabolism-related genes in bovine BMD-MC differentiated into adipocytes treated with either ADM or ADM + 20 μ M telmisartan. *HK* = hexokinase 2; *PFK* = phosphofructokinase; *ATGL* = adipose triglyceride lipase; *ACAC α* = acetyl CoA carboxylase α ; *ACAC β* = acetyl CoA carboxylase β ; *FASN* = fatty acid synthase. Significant differences indicated by ** ($p = 0.0027$) and *** ($p < 0.0001$).

Fig.6 a) Expression of *MyHC* in bovine BMD-MC treated with compounds to enhance myogenic differentiation. MDM = myogenic differentiation medium; IC = initial control (RNA extracted at confluence); NDC = no differentiation control (cultures maintained in

basal medium); DMSO = MDM + 0.5% Dimethyl sulfoxide; Sirt = MDM + sirtinol (10, 25, or 50 μ M); Tel = MDM + telmisartan (1, 10, or 20 μ M); BZ = ADM + bezafibrate (50, 100, or 200 μ M). Data are expressed as least square means \pm SEM (n = 4). Different letters indicate significant differences between columns ($p \leq 0.0591$). b) Relative expression of energy metabolism-related genes in bovine BMD-MC differentiated into myocytes treated with either MDM or MDM + bezafibrate 200 μ M. *HK* = hexokinase 2; *PFK* = phosphofructokinase; *ACAC α* = acetyl CoA caboxylase α ; *PPAR δ* = peroxisome proliferator activated receptor δ ; *FABP* = fatty acid binding protein. Significant differences are indicated by * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.001$) and *** ($p < 0.0001$).

Table 1. Primers designed to assess expression of metabolism-related genes.

Gene	Accession number	Oligonucleotide sequence Forward/Reverse	Product size (bp)	Product type
<i>PPARγ</i>	NM_181024.2	F: 5' catcttcagggtgtcagt R: 5' ggatatgaggacccatcct	186	qPCR
<i>PPARγ</i>	NM_181024.2	F: 5' gacttgaacgaccaagtaactc R: 5' ctctgctaatacaagtccctgtag	511	PCR
<i>HK2</i>	XM_002691189.1	F: 5' caccaactgattgctccgctc R: 5' taccaaccgcctaagactg	101	qPCR
<i>PFK</i>	NM_001080244.1	F: 5' cggacgctgcctatgtcttcg R: 5' cagtcaaacacgcccttgcc	173	qPCR
<i>ATGL</i>	FJ897536.1	F: 5' tgccttcaccatccgcttgctc R: 5' ccagcttcctcttggcgcgta	99	qPCR
<i>FASN</i>	NM_001012669.1	F: 5' aactgcatcgacaccgtgacc R: 5' ccccgatcaccttcttgagc	161	qPCR
<i>ACACα</i>	NM_174224.2	F: 5' ctcttcgacaggttcaagc R: 5' taatctctgatgcctgcgttg	144	qPCR
<i>ACACβ</i>	NM_001205333.1	F: 5' ccatccggttcgtagta R: 5' tctacaatcagctccacgtt	116	qPCR
<i>FABP4</i>	NM_174314.2	F: 5' acaggaaagtcaagagcatc R: 5' acattccagcaccatcttat	121	qPCR
<i>PPARδ</i>	NM_001083636.1	F: 5' ggtgaccctgctcaagtacg R: 5' acttgacggcaaacctgaac	178	qPCR

Table 2. Primers designed for qPCR housekeeping genes.

Gene	Accession number	Oligonucleotide sequence Forward/Reverse	Product size (bp)	Product type
<i>18S</i>	NR_036642.1	F: 5' ggagcgatttgtctgggta R: 5' gtaggtaggcacacgctga	214	qPCR
<i>RPL13a</i>	NM_001076998.1	F: 5' ctgccccacaagaccaagc R: 5' tggttccagccaacctca	188	qPCR
<i>YWHAZ</i>	NM_174814.2	F: 5' cggacacagaacatccagt R: 5' tttctcagcaccttccgtct	243	qPCR
<i>PPIA</i>	XM_0012529121.1	F: 5' agcactggggagaaaggatt R: 5' agccactcagtcttggcagt	247	qPCR
<i>EF1α</i>	XM_003587615.1	F: 5' tgcccttctgtcttacacc R: 5' cacaatgctaccgtgtcg	147	qPCR

Table 3. Primers designed to assess expression of stem cell markers.

Gene	Accession number	Oligonucleotide sequence Forward/Reverse	Product size (bp)	Product type
<i>CD29</i>	XM_005214148.2	F: 5' gacacgcaagaaaatccgat R: 5' accggcaatttagagacca	89	PCR
<i>CD44</i>	NM_174013.2	F: 5' cggacctgccaatgccttga R: 5' tgcacagtgggaggtgctg	226	PCR
<i>CD73</i>	BT026240.1	F: 5' ttctcaacagcagcatcca R: 5' cagtgccatccagatagaca	122	PCR
<i>CD90</i>	NM_001034765.1	F: 5' tgccgattgtgcgggaagca R: 5' ttgcccttctggcgacggt	198	PCR
<i>CD105</i>	NM_001076397.1	F: 5' ccatcaaaagcctgaccttgg R: 5' agtctgatgaccacctggt	138	PCR
<i>ABCG2</i>	NM_001037478.2	F: 5' agcagcccttcggettcca R: 5' agccagttgtgggctcatcca	218	PCR
<i>CD34</i>	NM_174009.1	F: 5' cagccaccagagctattccc R: 5' cccagcctttctccggtg	131	PCR
<i>CD45</i>	BC148881.1	F: 5' aagctgcgaggagggtaaacg R: 5' tgtgctccacctgcacat	206	PCR

Table 4. Primers designed for myogenic differentiation markers.

Gene	Accession number	Oligonucleotide sequence Forward/Reverse	Product size (bp)	Product type
<i>Pax7</i>	XM_002685738.1	F: 5' aagaaagccaagcacagcat R: 5' gtcctctcgggtgtagatg	204	PCR
<i>Pax3</i>	NM_001206818.1	F: 5' ccagagggcaaagcttacag R: 5' ggaatagctgtgggctggta	194	PCR
<i>Miogenin</i>	FJ979804.1	F: 5' gggcgtgtaagggtgtaag R: 5' gcgctctatgtactggatgg	267	PCR
<i>MEF2C</i>	NM_001046113.1	F: 5' tattccaccaggcagcaaga R: 5' tatectcccatcccttgcc	158	PCR
<i>MyoD1</i>	NM_001040478.2	F: 5' caacagcggacgacttct R: 5' caggaagtgcgagtgtt	128	PCR
<i>MRF4</i>	AB110601.1	F: 5' attaactacatcgagcgggtg R: 5' ttccttggcagttatcacgag	197	PCR
<i>Myostatin</i>	AF019761.1	F: 5' cctgaatccaacttaggcat R: 5' gttcatcacaatcaagcccaa	169	PCR
<i>Myf5</i>	NM_174116.1	F: 5' ctaatggaattggcagtcac R: 5' ctacttttgcctccacatacaca	247	PCR
<i>MyHC</i>	AB059399.2	F: 5' tgcagccatgagttcagaccagga R: 5' gttactgtcgccccagcctcg	219	PCR, qPCR
<i>Desmin</i>	NM_001081575.1	F: 5' ccaacaagaacaatgacgctct R: 5' ctactagcaaagecgtctct	157	PCR

Table 5. Putative transcription factor binding sites in the promoter region of genes related to muscle differentiation of cattle.

Type	Transcription Factor	Gen								
		<i>Pax-3</i>	<i>Myogenin</i>	<i>MRF-4</i>	<i>Myf-5</i>	<i>MEF2C</i>	<i>MyoD</i>	<i>MSTN</i>	<i>MyHC</i>	<i>Desmin</i>
PPARs	<i>PPAR-α</i> ^{1,3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>PPAR-α:RXR-α</i> ²	+	+	+	+		+	+	+	+
	<i>PPAR-γ</i> ^{3,4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>PPAR-γ:RXR-α</i> ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Myogenic	<i>Pax-3</i> ^{1,2,3,5}	+	+		+	+	+	+	+	+
Transcription	<i>Myogenin</i> ^{1,2,3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Factors	<i>MRF-4</i> ²								+	+
	<i>Myf-5</i> ²		+	+		+	+		+	+
	<i>MyoD</i> ^{2,3,4,5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>MEF2C</i> ^{2,3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹ *Rattus norvegicus*; ² *Homo sapiens*; ³ *Mus musculus*; ⁴ *Xenopus laevis*; ⁵ *Gallus gallus*. Minimum similarity percentage for each consensus sequence is 85%.

Fig.1

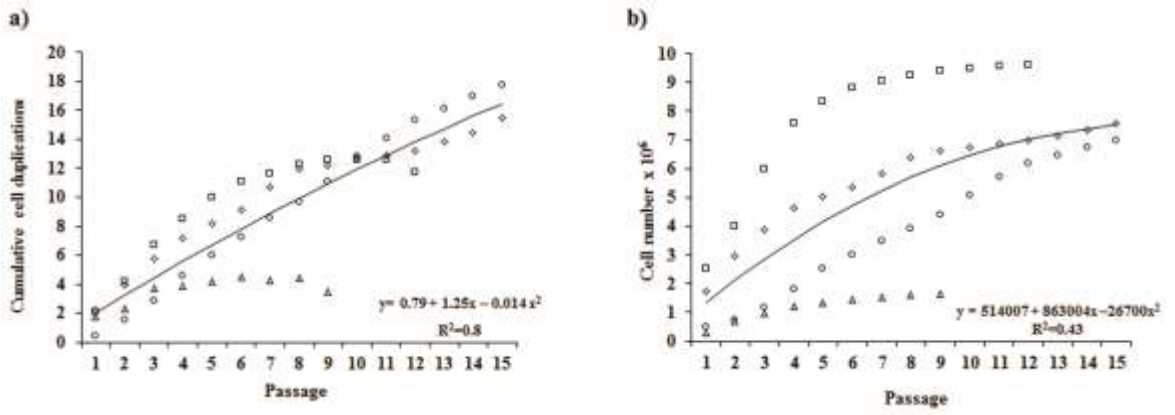


Fig.2

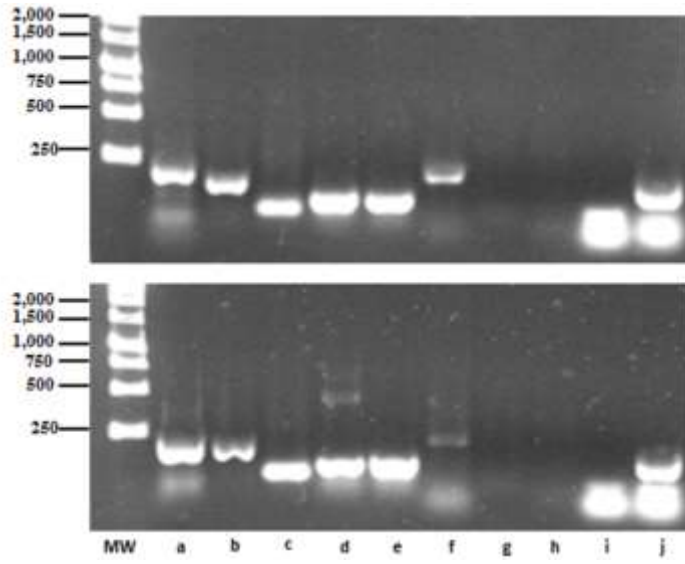


Fig.3

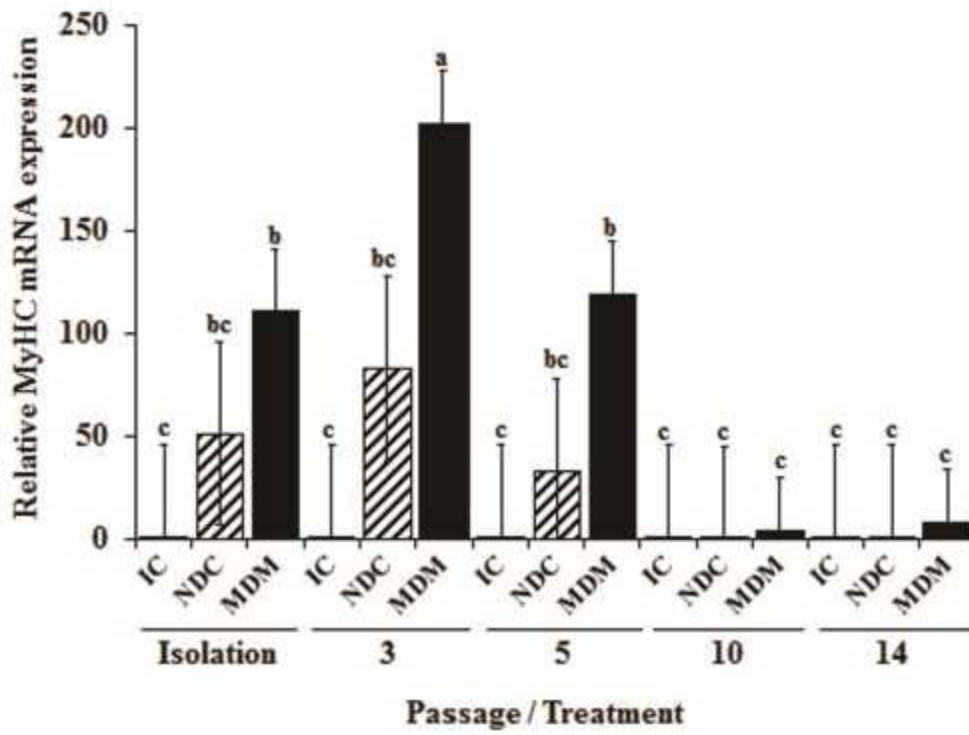
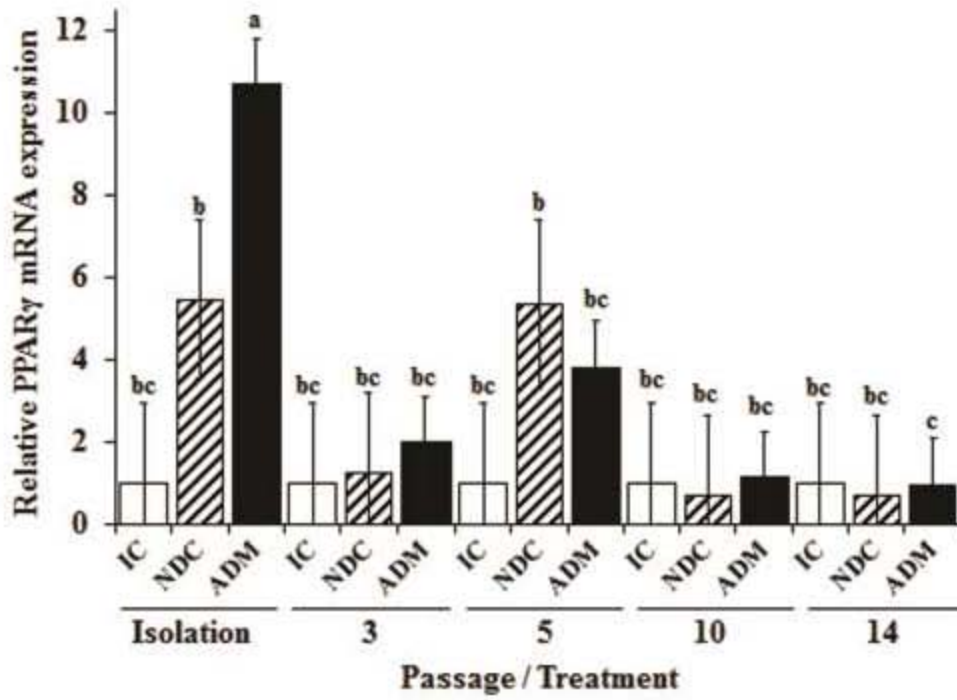


Fig.4

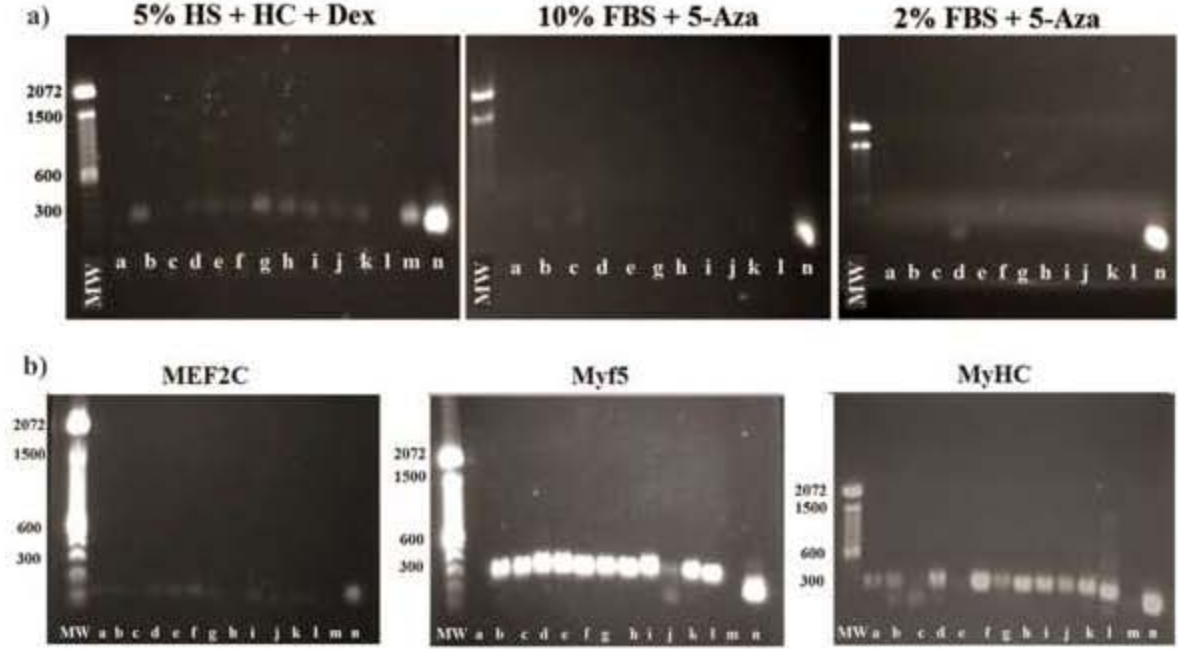


Fig.5

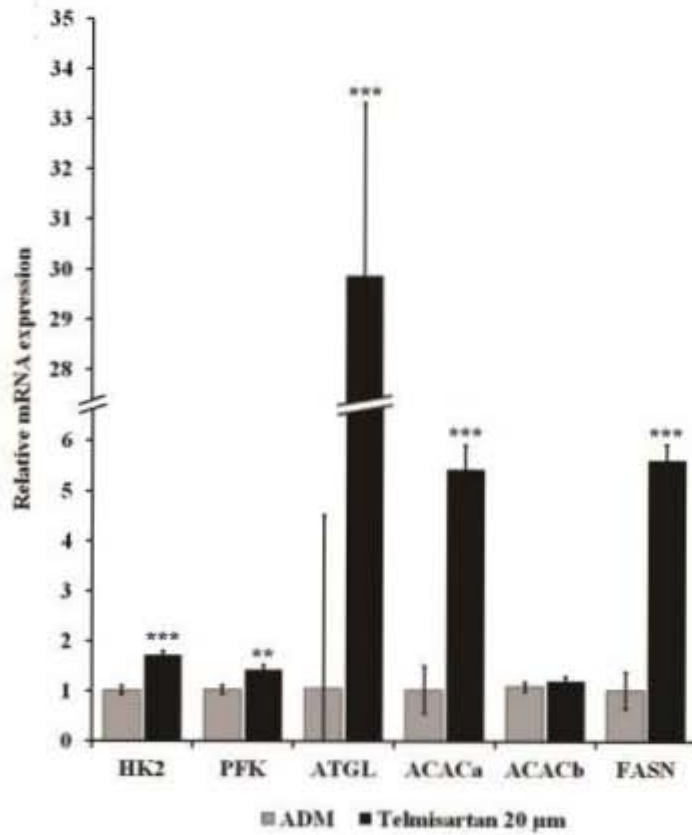
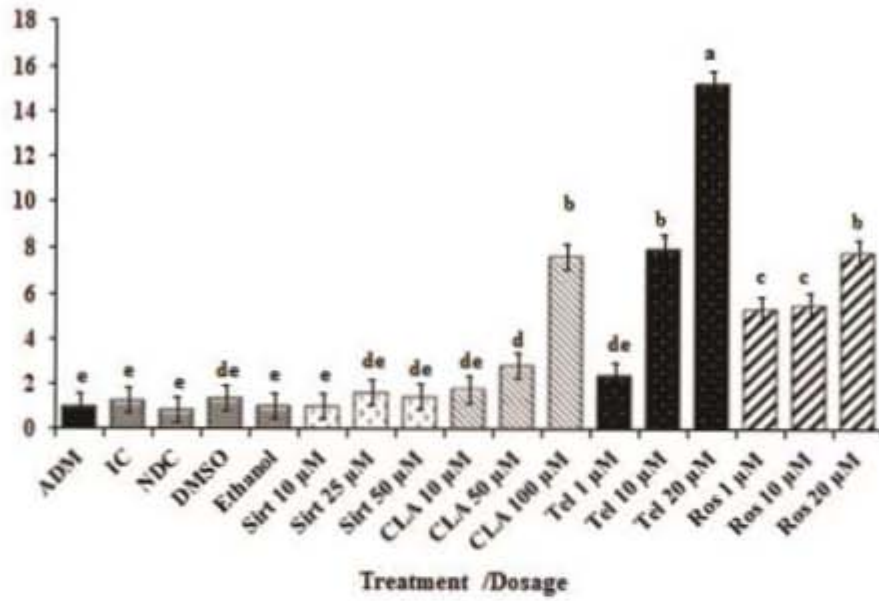
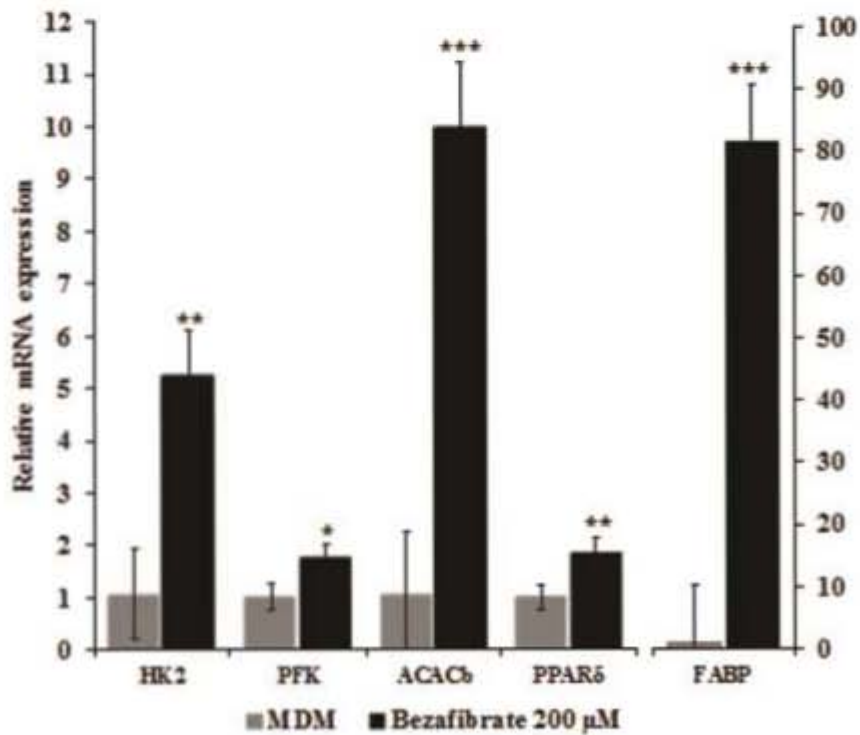
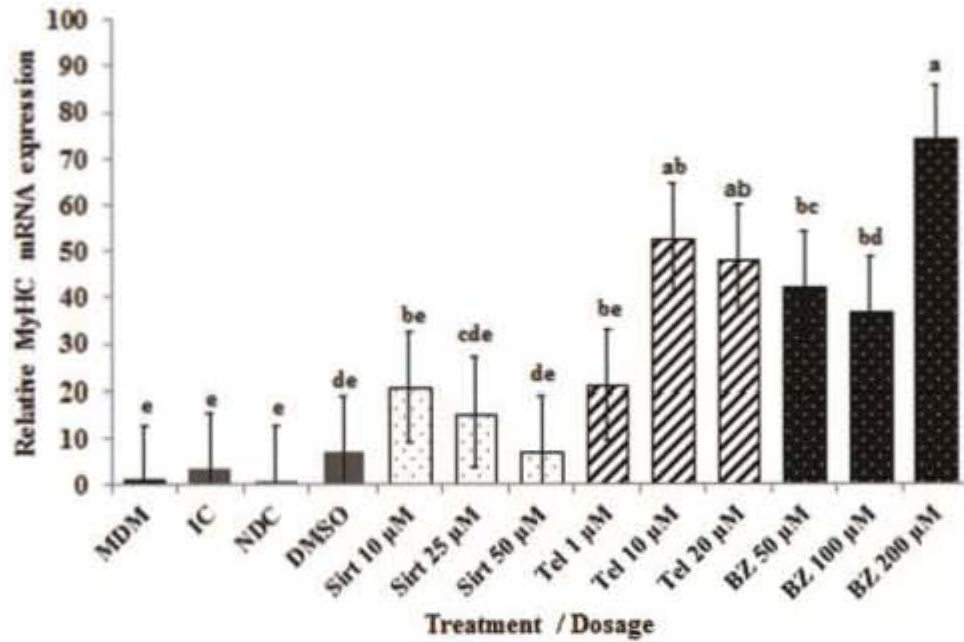


Fig.6



5. DISCUSIÓN

Diferentes estudios han mostrado que las células troncales mesenquimales (CTM) son altamente proliferativas y pueden alcanzar de 30 a 50 duplicaciones celulares antes de entrar en senescencia (Colter *et al.*, 2000; Colleoni *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo para el número de duplicaciones celulares y el número total de células indican que las CTM obtenidas de médula ósea de bovino poseen una capacidad de proliferación similar a la observada en humanos (Bonab *et al.*, 2006; Schallmoser *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011), cerdos (Zeng *et al.*, 2006; Comite *et al.*, 2010) o equinos (Vidal *et al.*, 2006; Colleoni *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012). Sin embargo, diversos factores pueden influir sobre dicha capacidad de proliferación en estas células, incluyendo, entre otros, la variabilidad individual, la edad del donador, la composición del medio o la densidad de cultivo.

Se ha reportado que la variabilidad individual puede afectar la capacidad de proliferación de las CTM. En ovejas, Rhodes *et al.* (2004) reportaron que la capacidad de proliferación de CTM de médula ósea obtenidas de animales de diferente edad y raza presentaron un amplio rango de tiempo en cultivo, de 13 a 230 días, para alcanzar un número fijo de células totales (45×10^6 células) sin una correlación estadística significativa entre la tasa de proliferación con la edad ($p = -0.57$) o la raza ($p = 0.64$). Schallmoser *et al.* (2010) reportaron que las CTM humanas pueden entrar en senescencia cuando estas alcanzan entre 14.5 y 19.6 duplicaciones celulares (entre el pase celular 9 y 14) mientras que Cheng *et al.* (2011) reportaron que las CTM alcanzan la senescencia a las 33 duplicaciones celulares (pase celular 13). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo en lo que se refiere a la capacidad de proliferación de las CTM a largo plazo. Asimismo, se ha sugerido que bajo las condiciones de cultivo usadas en este trabajo, después de ser aisladas y durante la formación de colonias, las CTM pueden tener entre 7 y 15 duplicaciones celulares (Wagner *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012). En CTM obtenidas de humanos de pases celulares tempranos y tardíos mantenidos por periodos de cultivo prolongados se han reportado cambios en el perfil de expresión génica que semejan a los

perfiles de expresión de donadores jóvenes o ancianos (Wagner *et al.*, 2009; Schallmoser *et al.*, 2010).

Los componente del medio como factores de crecimiento, vitaminas, nutrientes o metabolitos, pueden modificar la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTM. Se ha reportado que el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF-2) incrementa la tasa de proliferación de las CTM (Bianchi *et al.*, 2003), mientras que el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) inhibe la proliferación pero promueve la migración y diferenciación de las CTM hacia cardiomiocitos (Forte *et al.*, 2006). El ácido láctico, un metabolito celular, se ha relacionado con una disminución de la capacidad de proliferación de las CTM así como con la modificación de la capacidad de diferenciación de estas células; en este sentido Chen y Tan (2009) reportan que en CTM derivadas de conejo concentraciones de 15mM de ácido láctico y un pH menor a 7.2 disminuyen el potencial de proliferación celular y de diferenciación hacia los linajes osteogénico y condrogénico, mientras que incrementa la diferenciación adiposa.

Componentes del medio como la glucosa y su concentración en este pueden modificar la capacidad proliferativa de las CTM, Cramer *et al.* (2010) en células troncales derivadas de tejido adiposo reportaron que concentraciones de glucosa mayores a 500 mg/dL (27.75 mM) inhibe la capacidad de las células para formar colonias e incrementa el número de células senescentes. Este mismo grupo también reportó que concentraciones de 250mg/dL (13.88 mM) incrementan la expresión de genes proapoptóticos como p53, caspasa 3 y caspasa 8. Estos datos son apoyados también por los resultados de Lo *et al.* (2011), quienes encontraron que a concentraciones de glucosa menores a 135 mg/dL (7.49 mM) mejoran su potencial de proliferación y diferenciación, mientras que disminuye la expresión de p16 así como la actividad de la β galactosidasa, ambos, indicadores de senescencia celular.

En este sentido, la búsqueda del medio más adecuado para las CTM es un área de investigación activa; Dhanasekaran *et al.* (2013) por ejemplo, estudiaron diferentes medios disponibles comercialmente (DMEM-LG, α -MEM, DMEM F12 y DMEM KO) en CTM

humanas derivadas de médula ósea y encontraron que los medios más adecuados son DMEM-LG y α -MEM para el cultivo prolongado de estas células.

La densidad de cultivo celular es otro factor que afecta la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTM. Se ha reportado que células a baja densidad pueden alcanzar un mayor número de duplicaciones celulares. Colter *et al.* (2000) reportaron que células sembradas a una baja densidad (< 5 células/cm²) alcanzan 50 duplicaciones celulares, mientras que células sembradas a densidades mayores solo alcanzaron 15 duplicaciones celulares. Por otro lado se ha sugerido que densidades de siembra mayores a 2,000 células/cm² presentan una capacidad de proliferación más variable y en general menor (Zimmerman *et al.*, 2003); sin embargo Colleoni *et al.* (2005) reportaron que en CTM de bovino y cerdo estas células pueden alcanzar, respectivamente, entre 50 y 40 duplicaciones celulares con densidades de cultivo de 5,000 células/cm².

Con esta información es posible que, bajo las condiciones experimentales usadas en este trabajo, las CTM de bovino no se encontraran bajo condiciones de cultivo óptimas, sin embargo, los resultados obtenidos indican que las CTM de bovino tienen una buena capacidad proliferativa que está en concordancia con datos publicados previamente para este tipo de células.

La capacidad de cultivar y expandir el número de CTM por amplios periodos de tiempo permite que éstas puedan ser usadas en diferentes aplicaciones que requieren el uso de gran cantidad de células. Dentro de los posibles usos de las CTM se pueden incluir tecnologías de transferencia nuclear como la clonación (como células donadores de núcleo) de animales de calidad superior o de especies en peligro de extinción (Jang *et al.*, 2011; Berg *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2006) así como para la producción de carne en condiciones *in vitro* (Bhat y Fayaz, 2011; Langelaan *et al.*, 2010; Mironov *et al.*, 2009). Estas nuevas aplicaciones abren un campo de investigación en áreas como la biología celular y la ingeniería de tejidos para el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo (componentes y concentración de estos en el medio, densidad celular, concentración de CO₂ y requerimientos de citocinas,

hormonas y factores de crecimiento) y sistemas de cultivo y diferenciación a mayor escala de las CTM de bovino.

Además de su capacidad de proliferación, las CTM tienen el potencial de diferenciarse a diferentes linajes celulares. Los resultados del presente trabajo muestran que las CTM de bovino derivadas de médula ósea son capaces de diferenciarse hacia adipocitos y miocitos. En ambos casos esta capacidad de diferenciación es mayor en pases celulares tempranos y disminuye con los pases posteriores. Estos resultados son consistentes con reportes previos que indican que la mayor capacidad de diferenciación celular se encuentra en los pases celulares tempranos y que dicha capacidad disminuye en los pases tardíos o a densidades de cultivo elevadas en CTM de médula ósea de humano (Cheng *et al.*, 2011; Bonab *et al.*, 2006), ratón (Kretlow *et al.*, 2008) y mono rhesus (Izadpanah *et al.*, 2005). Asimismo, Kretlow *et al.* (2008) reportaron que la capacidad de proliferación, adhesión y diferenciación de las CTM es afectada tanto por la edad del donador como el pasaje, encontrando estas capacidades alteradas cuando comparó cultivos del primer y sexto pases celulares de donadores jóvenes y viejos. Bonab *et al.* (2006) también encontraron cambios en la capacidad de diferenciación de CTM de humano reduciéndose la capacidad adipogénica de las CTM en un 10% para el sexto pase celular y en un 60% para células del décimo pase celular.

Para la diferenciación adiposa, los resultados del presente trabajo indican que las CTM derivadas de médula ósea de bovinos poseen esta capacidad, debido a la expresión del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas γ (PPAR γ) en estas células. Esta capacidad ha sido reportada previamente para las CTM de bovino por Bosnakovski *et al.* (2005) y Colleoni *et al.* (2005) así como para otras especies como cerdos (Bosch *et al.*, 2006; Colleoni *et al.*, 2005), equinos (Vidal *et al.*, 2006), ovinos (McCarty *et al.*, 2009; Eslaminejad *et al.*, 2007) y aves (Khatri *et al.*, 2009). Sin embargo, en la información disponible actualmente no se ha identificado el tiempo óptimo (pasaje) para inducir la diferenciación adiposa de las CTM de bovino.

Por otro lado McCarty *et al.* (2009), reportaron que en CTM obtenidas de ovinos y sujetas a diferenciación adiposa, la expresión de PPAR γ , leptina y lipoproteína lipasa (LPL) es tiempo dependiente, encontrando que la expresión de leptina incrementaba con el tiempo de cultivo, mientras que la expresión de LPL y PPAR γ se incrementaba drásticamente hasta el día 12 de cultivo y disminuía gradualmente hasta el día 30 de cultivo a niveles similares a los de los cultivos no tratados. Rallapalli *et al.* (2009) en MSC de humano reportaron datos similares, indicando que la expresión de la proteínas de unión al promotor CCAAT β (C/EBP β) es mayor en el día 1 de tratamiento, PPAR γ se expresa del día 1 a 9 y que la expresión de LPL alcanza su máximo al día 7 de tratamiento y se mantiene en niveles altos por el resto del tratamiento. En este sentido Berg *et al.* (2007) encontraron que en CTM de ciervo (asta) el 99% de las células tratadas se diferencian y que los niveles de expresión de PPAR γ y gliceráldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) aumentan 2 y 3 veces.

Los resultados de este trabajo indican que el mayor potencial de diferenciación de estas células se encuentra en los pases celulares tempranos (las células obtenidas en el aislamiento presentaron la mayor expresión de PPAR γ) como previamente se había reportado para el caso de células obtenidas de CTM humanas y de ratón (Kretlow *et al.*, 2008; Bonab *et al.*, 2006).

Investigaciones previas han reportado la capacidad de diferenciación miogénica de CTM aisladas de médula ósea (Akavia *et al.*, 2008; Dezawa *et al.*, 2005; Colleoni *et al.*, 2005) y de cordón umbilical (Gang *et al.*, 2004). Los resultados aquí reportados muestran que las CTM derivadas de médula ósea de bovino pueden ser inducidas a diferenciarse hacia miocitos con el uso de un medio suplementado con suero equino, hidrocortisona y dexametasona. Demostrando esta diferenciación mediante la expresión de Cadena pesada de miosina (MyHC), un marcador de diferenciación terminal de las células musculares. En contraste, estas mismas células no fueron capaces de diferenciarse al linaje miogénico con el uso de 5'azacitidina, lo cual difiere de resultados previos en CTM de rata (Akavia *et al.*, 2008, Hou *et al.*, 2008), ratón (Shiota *et al.*, 2007) humano (Drost *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), cerdo (Moscoso *et al.*, 2005; Colleoni *et al.*, 2005) y bovino (Colleoni *et al.*, 2005) en los que se encontró la diferenciación de estas células a músculo esquelético o cardíaco.

Asimismo, en este trabajo se reporta que las CTM de bovino inducidas a la diferenciación muscular expresan los factores miogénicos: Myf5, MRF4, miogenina, MEF2C y Miostatina, así como los marcadores de diferenciación desmina y MyHC pero no mostraron la expresión de Pax7 y MyoD.

En este sentido, MyoD es un factor de transcripción considerado necesario para el inicio del programa de diferenciación de las células musculares, al nivel de compromiso celular y que puede inducir la diferenciación de células pertenecientes a otro linaje tales como fibroblastos o condrocitos, mientras que la proteína miogenina se considera necesaria para la diferenciación terminal de las células comprometidas (Berkes y Tapscott, 2005). Diferentes investigaciones, bajo diversas condiciones experimentales, concernientes a la diferenciación de células troncales hacia el linaje muscular han encontrado la expresión de MyoD en las células diferenciadas (Gang *et al.*, 2004; Dezawa *et al.*, 2005; Shiota *et al.*, 2007; Gekas *et al.*, 2010). Esto se debe a que MyoD regula positivamente los genes premiogénicos Meox1, Pax7, Six1 y Eya2 así como los genes de miogenina, MEF2C y Myf5 en mioblastos para inducir la diferenciación de los precursores musculares (Gianakopoulos *et al.*, 2011). Además, Shang *et al.* (2007), en CTM derivadas de médula ósea de rata determinó que el patrón de expresión a través del tiempo para los diferentes factores miogénicos es el siguiente: Pax3 (día 0), Pax7 (día 2), Myf5 and MyoD (día 4) y MRF4, Miogenina y MyHC (día 6).

Si bien la función del factor miogénico MRF4 ha sido mayoritariamente relacionada con la proliferación (Jin *et al.*, 2007) y diferenciación terminal que con la determinación del linaje muscular y Myf5 está principalmente relacionado al compromiso celular; se sabe que estos factores miogénicos y la miogenina también pueden inducir la diferenciación muscular hasta cierto punto, e incluso entre estos tres factores pueden reemplazar parcialmente sus funciones (Berkes y Tapscott, 2005). En este contexto, Kassari-Duchossoy *et al.* (2004) en un modelo de ratón doble nulo para MyoD y Myf5 demostraron que la expresión de MRF4 es capaz de inducir la proliferación y diferenciación de mioblastos. Schnapp *et al.* (2009) fueron capaces de rescatar parcialmente la miogénesis en embriones de pez cebra mediante la inyección de RNA mensajero de MRF4 en los cuales la transcripción de MyoD y Myf5

estaba bloqueada, mientras que la inyección de RNA mensajero de miogenina no logró rescatar la miogénesis. También Xynos *et al.* (2010) en células troncales hematopoyéticas encontraron que estas células pueden expresar Myf5 y diferenciarse a miocitos sin la expresión de Pax7 y MyoD. En conjunto estos datos y los reportados en el presente trabajo sugieren que las CTM de médula ósea de bovino tienen, o pueden tener, un patrón de diferenciación muscular diferente en el que la expresión de Myf5 y MRF4 son suficientes para inducir el compromiso y determinación de estas células hacia la diferenciación muscular, en lugar de la presencia obligatoria de MyoD como se ha reportado para otras especies.

El mejorar la capacidad de diferenciación de las CTM hacia linajes específicos es un área activa de investigación tanto en la biología de células troncales como en la ingeniería de tejidos. Los diferentes hallazgos en estas áreas pueden llevar al desarrollo de nuevas tecnologías útiles también para la producción animal. En este sentido, y dada la relación de los PPARs con la diferenciación celular y la regulación metabólica, en este trabajo se evaluaron una serie de compuestos [sirtinol, rosiglitazona, telmisartan, ácido linoleico conjugado 9-cis, 11-trans (CLA 9Z, 11E) y bezafibrato] que pudieran mejorar la diferenciación adiposa y muscular de estas células mediante el incremento de la expresión, actividad o ambas de estos factores de transcripción. Los resultados del presente trabajo indican que la capacidad de diferenciación adiposa de las CTM puede incrementarse mediante el uso de rosiglitazona, telmisartan o CLA 9Z, 11E, mientras que el telmisartan y el bezafibrato mejoran la diferenciación muscular. Siendo el telmisartan y el bezafibrato los compuestos que indujeron la mayor expresión de PPAR γ (indicador de diferenciación adiposa) y MyHC (indicador de diferenciación muscular) respectivamente.

El sirtinol es un compuesto que inhibe la actividad de las desacetilasas de histonas dependientes de NAD de clase III, también denominadas sirtuinas. Dentro de este grupo de enzimas, Sirt1 se ha relacionado con la regulación del metabolismo de energía, encontrándose que la sobreexpresión de ésta inhibe la actividad y expresión de PPAR γ (Picard *et al.*, 2004). Estas acciones de Sirt1 sobre PPAR γ y por lo tanto en la diferenciación adiposa y la lipogénesis, se han reportado en adipocitos de humano (Costa

Cdos *et al.*, 2011) y cerdo (Shan *et al.*, 2009) así como en CTM de ratón (Bäckesjo *et al.*, 2006). También, Jiang *et al.* (2012) reportó que el sirtinol puede incrementar la tasa de lipogénesis en adipocitos diferenciados sin afectar la tasa de lipólisis en estas células. En este trabajo se propuso que el uso de un inhibidor de las sirtuinas podría mejorar la diferenciación adiposa y muscular de CTM de bovino, sin embargo, los resultados de este mostraron que el sirtinol no tiene efecto en la diferenciación adiposa o muscular de estas células.

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un grupo de varios ácidos grasos que pueden actuar como ligandos naturales de los PPAR siendo el CLA 9-*cis* 11-*trans* (CLA 9Z, 11E) y el CLA 10-*cis* 12-*trans* (CLA 10Z, 12E) sus isómero más abundantes y los cuales se encuentran en los productos lácteos y cárnicos. Es por ello que estos ácidos grasos se han relacionado con la regulación del metabolismo de lípidos. En diferentes modelos se ha encontrado que el CLA 10Z, 12E inhibe la expresión de PPAR γ así como de proteínas relacionadas con el anabolismo y almacenamiento de ácidos grasos (anhidrasa carbónica 3, CD36, GLUT4, GPDH) y la adipogénesis (C/EBP α), mientras que el CLA 9Z, 11E mejora la diferenciación adiposa y la lipogénesis mediante el aumento en la expresión de proteínas como PPAR γ , FASN, estearil CoA desaturasa, GPDH y FABP4 (Visioli *et al.*, 2012; Platt y El-Sohemy, 2009; Brandebourg y Hu, 2005). Los resultados del presente trabajo en cuanto a la diferenciación adiposa mostraron que esta se incrementa con la suplementación de CLA 9Z, 11E en el medio de cultivo y además que este incremento es dependiente de la dosis. Esto concuerda con datos previamente reportados en ratas (Zhou *et al.*, 2008), humanos (Platt y El.Sohemy, 2009) y cerdos (Barnes *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2007) en los que se incrementó la expresión de PPAR γ y de genes relacionados. Asimismo, las células tratadas con CLA 9Z, 11E mostraron un tamaño mayor y vacuolas de mayor tamaño respecto a las células del control positivo y los demás tratamientos tal como se había reportado previamente en cerdos (Barnes *et al.*, 2012) y ratas (Lopes *et al.*, 2008). Este incremento en el tamaño puede deberse al efecto de este compuesto sobre el metabolismo de lípidos ya que el CLA 9Z 11 E no promueve la lipólisis o la oxidación de ácidos grasos si no que promueve un incremento en la síntesis de ácidos grasos.

El efecto de las tiazolidinedionas en la diferenciación de preadipocitos ha sido ampliamente documentada, como lo resume Hausman *et al.* (2008), en este trabajo se usó la Rosiglitazona como un ligando específico de PPAR γ para determinar su efecto adipogénico en las CTM de médula ósea de bovino. Los resultados obtenidos indican que este compuesto mejora la diferenciación adiposa de las células en cultivo tal como se había reportado previamente en modelos de ratón (Crossno *et al.*, 2006; Shockley *et al.*, 2009) y humano (Ninomiya *et al.*, 2010). De forma interesante, con ambos compuestos (CLA 9Z, 11E y rosiglitazona) indujeron la diferenciación adiposa en un grado similar a las dosis más altas usadas, sin embargo la rosiglitazona posee una afinidad mayor para unirse PPAR γ por lo que se requiere de dosis menores en comparación a CLA9Z, 11E. Esto concuerda con lo anteriormente reportado por Oberfield *et al.* (1999), quienes determinaron que la rosiglitazona a concentración 1 μ M puede inducir eficientemente la diferenciación adiposa en células multipotentes de la línea C3H10T 1/2 después de 6 días de tratamiento.

El Telmisartan es un bloqueador de los receptores de Angiotensina comúnmente utilizado como antihipertensivo pero que ha demostrado poseer la capacidad para activar a las diferentes isoformas de PPAR en diferentes estudios clínicos y experimentales (He *et al.*, 2010), por lo que recientemente se le ha reconocido como un agonista parcial para esta familia de receptores nucleares. Más aún, recientemente se ha determinado su mecanismo de unión a PPAR γ (Amano *et al.*, 2012). Debido a que se trata de un agonista parcial de los PPAR, se usó este compuesto para mejorar tanto la diferenciación adiposa como muscular de las CTM de bovino (mediante la activación de PPAR γ y PPAR δ , respectivamente). Los resultados obtenidos indican que este compuesto también induce la diferenciación adiposa de las CTM de bovino y que esta es mayor a la inducida por la rosiglitazona (un agonista específico de PPAR γ) cuando se usan dosis iguales de ambos compuestos (10 o 20 μ M). Asimismo, el cambio en los niveles de expresión de PPAR γ se incrementa de una forma dependiente de la dosis. Se ha reportado que el uso de telmisartan en dosis de 5 a 20 μ M activó la transcripción de un gen reportero cuyo promotor incluía un elemento responsivo a PPAR en células CV 1; así como la adipogenesis en células C3H10T1/2 y 3T3 L1, lo cual se demostró mediante la presencia de gotas teñidas con rojo oleoso en células tratadas con

una dosis de 10 μ M de Telmisartan (Erbe *et al.*, 2006). Tagami *et al.* (2009) encontraron que el Telmisartan usado en concentraciones de 10 μ M induce la activación de PPAR γ por lo menos a un 35% en relación a la respuesta inducida por troglitazona y pioglitazona en células TSA-201, y que esta capacidad de activación se conserva en las células mutantes para PPAR γ , mientras que la activación por pioglitazona y troglitazona se encontró disminuida. En lo que se refiere a la diferenciación muscular el presente trabajo muestra por primera vez que el tratamiento de CTM de bovino con telmisartan incrementa la expresión de MyHC y que dicho efecto puede deberse a la capacidad de este compuesto para unirse y activar a PPAR δ .

El bezafibrato, es un ligando sintético de PPAR usado principalmente para el control de las cardiopatías coronarias gracias a su capacidad de disminuir los lípidos plasmáticos e incrementar las lipoproteínas de alta densidad. A través de la activación de PPAR α y la transcripción (LPL, Apolipoproteína AI, Acil CoA sintetasa, FABP, enzimas de la β -oxidación) o silenciamiento (Apolipoproteína CIII, Acetil CoA carboxilasa, ciclooxigenasa 2) de sus genes blanco, el bezafibrato tiene como efectos principales un incremento en la lipólisis, la remoción de lipoproteínas ricas en triglicéridos y en la β -oxidación así como la disminución de la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Goldenberg *et al.*, 2008). Mientras que la activación de PPAR δ con este compuesto mejora la oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de energía y la termogénesis adaptativa (Tenenbaum y Fisman, 2012). Entre los diferentes compuestos aplicados para mejorar la diferenciación muscular, el bezafibrato mostró la mayor expresión de MyHC. En este sentido el incremento en la expresión de este marcador terminal de la diferenciación muscular tanto en el bezafibrato como el telmisartan puede deberse a la activación directa de PPAR δ y la subsecuente transcripción de factores miogénicos que pueden ser modulados por este receptor nuclear.

En este sentido Gaudel *et al.* (2008) reportaron que el tratamiento con GW0742, un agonista de PPAR δ , provoca un aumento transitorio de los factores miogénicos MyoD1 y Myf5 en el músculo tibial anterior de ratones adultos C57BI6J. Este incremento fue detectable a las 2 horas de aplicar el tratamiento y volvió a los niveles del grupo control después de 24 horas para el caso de Myf5, mientras que para MyoD1 dicho incremento se

presentó 5 horas después del tratamiento y se mantuvo hasta las 96 horas posteriores al tratamiento. Asimismo, Bonala *et al.* (2012) encontró que la activación de PPAR δ con el ligando específico L165041 incrementa la proliferación de la línea celular C2C12 así como la diferenciación de estas en un 55%. Este mismo equipo encontró un incremento en la expresión de MyoD1, miogenina y un incremento en la cantidad de la MyHC. Por otro lado, el Factor de Crecimiento y diferenciación asociado a la proteína sérica-1 (Gasp 1) se ha identificado como un gen blanco para PPAR δ ya que en su secuencia posee elementos de respuesta a PPAR en su región promotora. Gasp 1 es una proteína que interactúa con Miostatina (un factor miogénico que inhibe la diferenciación muscular) inhibiendo la señalización de ésta y por lo tanto, la expresión de Gasp 1 permite la proliferación y diferenciación de las células musculares.

Una vez que se determinaron los compuestos y dosis que indujeron una mayor expresión de PPAR γ para la diferenciación adiposa y de MyHC para la diferenciación muscular se estudió el estado del metabolismo de energía en las células diferenciadas.

Los resultados del presente trabajo indican que las CTM de bovino diferenciadas a adipocitos poseen un metabolismo de glucosa más eficiente que, además de cubrir las necesidades energéticas de las células, puede proveer sustratos para una mayor síntesis y movilización de ácidos grasos. En este sentido los cambios encontrados en la expresión de HK2 indican una mayor captación de glucosa para la glucólisis, y se ha reportado que esta puede incrementar la expresión y actividad de ACAC y FASN en el tejido adiposo (Foufelle *et al. et al.*). Se ha reportado que en adipocitos 3T3-L1 el telmisartan incrementa la expresión y translocación de GLUT4 a la membrana plasmática a través de un mecanismo regulado por PPAR γ , y que este mecanismo es independiente de la habilidad de éste fármaco para incrementar la sensibilidad a la insulina (Furukawa *et al.*, 2011). La PFK es una enzima clave en la vía glucolítica que también está regulada por la activación de PPAR γ y se ha reportado que su incremento puede inducir la deposición de grasa en ratones y en células 3T3-L1 (Hou *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una sobreexpresión de este gen en respuesta al tratamiento con telmisartan, sin embargo, su expresión relativa fue menor a la de HK2. Estos resultados implican que,

aunque la captación de glucosa se incrementó en las células tratadas, no toda la glucosa entró a la vía glucolítica, si no que puede existir un excedente de glucosa que puede ser dirigido hacia vías metabólicas alternas como la vía de la pentosa fosfato. En conjunto esto puede significar que durante el tratamiento con telmisartan el metabolismo de glucosa puede generar tanto energía (ATP) como los sustratos (acetil CoA y NADPH) necesarios para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En cuanto al metabolismo de lípidos en las células tratadas con telmisartan en el presente trabajo se encontró un aumento en la expresión de ACACa y FASN; ambas enzimas son cruciales para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. ACACa cataliza la carboxilación, dependiente de ATP, de la acetil-CoA para formar malonil-CoA, mientras que este producto es el sustrato necesario para que la FASN inicie la síntesis de ácido palmítico (Barber *et al.*, 2005). La ATGL es una enzima que cataliza la primera reacción que regula la velocidad con que ocurre la hidrólisis completa de los triglicéridos y su transcripción puede ser regulada durante la diferenciación adiposa por PPAR γ y FoxO1 (Lass *et al.*, 2011), este gen también se encontró sobreexpresado durante el tratamiento con telmisartan de las CTM de bovino. Por otra parte, la enzima ACACb, que regula el metabolismo de ácidos grasos y cuyo producto, malonil CoA, es un potente inhibidor de la carnitina palmitoitransferasa I (CPT-1) que es la enzima responsable para la captación de ácidos grasos por la mitocondria (Benson *et al.*, 2004), no mostró cambios en su expresión a nivel de RNA; aunque este mismo grupo reportaron una disminución del 60 a 70% en la expresión de esta enzima en miotubos de ratón. Estos resultados en el metabolismo de lípidos de las CTM de bovino tratadas con telmisartan indican que estas células tienen una tasa de lipogénesis *de novo* incrementada (vía ACACa y FASN) y una mayor tasa de lipólisis (ATGL) mientras que la oxidación de ácidos grasos permanece inalterada y a niveles similares de los cultivos usados como controles. En conjunto estos resultados pueden implicar que estas células poseen un metabolismo de energía más activo en el cual la captación y utilización de la glucosa es más eficiente mientras que la síntesis de ácidos grasos y su movilización también se encuentran incrementadas.

Para las células bajo diferenciación muscular y tratadas con bezafibrato el incremento en la expresión de las enzimas glucolíticas HK2 y PFK, el transportador de ácidos grasos FABP

y el factor de transcripción relacionado con el catabolismo de lípidos PPAR δ , indican un mejor metabolismo de energía. En conjunto los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de expresión de estos genes sugieren un rearrreglo de varias vía metabólicas involucradas en la captación, almacenamiento y utilización de los sustratos energéticos en las CTM diferenciadas a miocitos y tratadas con bezafibrato. En el caso de la HK2 la mayor expresión de esta en relación al cambio en la expresión de PFK indica que, aun cuando la tasa de glucolisis se incrementó, existe un excedente de glucosa fosforilada dentro de estas células y este puede ser dirigido a vías alternas como la glucogénesis. El incremento en la FABP señala un incremento en la captación de ácidos grasos en las células tratadas, mientras que el incremento en PPAR δ indica una mayor utilización y oxidación de ácidos grasos con respecto a los cultivos control. Sin embargo en los resultados obtenidos en este trabajo ACACb se incrementó notablemente en los cultivos tratados con bezafibrato. Esto puede parecer contradictorio a primera vista cuando se compara con los niveles de expresión encontrados para FABP y PPAR δ (indicadores de un mayor catabolismo de ácidos grasos) ya que bajo condiciones normales ACACb inhibe a CPT-1 y por lo tanto la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial. Pero al tomar en cuenta la mayor tasa de glucolisis en las células tratadas se puede explicar este resultado debido que ACACa y ACACb son enzimas que se activan por el citrato (un metabolito de la glucolisis) y por lo tanto el resultado de esta glucolisis incrementada será la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo (vía ACACa) o la inhibición de la oxidación de ácidos grasos en el tejido muscular (vía ACACb).

6. CONCLUSIONES

Las CTM derivadas de la médula ósea de bovinos poseen una capacidad de proliferación similar a la previamente reportada para otras especies, además de la capacidad de diferenciarse hacia los linajes muscular y adiposo, siendo esta capacidad mayor en los pases celulares tempranos.

Los compuestos agonistas de los PPAR pueden mejorar la capacidad de diferenciación de estas células. En este sentido, la diferenciación adiposa se puede mejorar con el uso de telmisartan, rosiglitazona o CLA 9Z, 11E, siendo el telmisartan en una dosis de 20 μM el que presentó una mayor diferenciación adiposa. Mientras que para la diferenciación muscular el uso de bezafibrato y telmisartan inducen ésta eficientemente, siendo el bezafibrato en una concentración 200 μM el compuesto que induce la mayor diferenciación muscular.

El uso de agonistas de PPAR mejora el metabolismo energético de las CTM diferenciadas a ambos linajes celulares, permitiendo en el caso de la diferenciación adiposa una mayor captación y utilización de glucosa así como una lipogénesis y movilización de triglicéridos incrementadas. En el caso de las CTM diferenciadas permite una mayor captación y utilización de glucosa y ácidos grasos.

Los resultados obtenidos indican que el uso de agonistas de PPAR puede modular la diferenciación de estas células, pero además abren la posibilidad de usar estos compuestos experimentalmente en animales de producción para determinar qué efectos tienen sobre la calidad de la canal. En principio, los resultados obtenidos en este trabajo permiten asumir que al modificar con estos compuestos la diferenciación adiposa o muscular se pueden obtener productos cárnicos de acuerdo a las preferencias del mercado y con una mayor calidad sin afectar negativamente el metabolismo de estos tejidos.

7. LITERATURA CITADA.

- Akavia, U. D., Veinblat O. and Benayahu D. 2008. Comparing the transcriptional profile of mesenchymal cells to cardiac and skeletal muscle cells. *J. Cell Physiol.* 216: 663-672
- Amano, Y., Yamaguchi T., Ohno K., Niimi T., Orita M., Sakashita H. and Takeuchi M. 2012. Structural basis for telmisartan-mediated partial activation of PPAR gamma. *Hypertens. Res.* 35: 715-719
- Bäckesjö, C. M., Li Y., Lindgren U. and Haldosén L. A. 2006. Activation of Sirt1 decrease adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Bone. Miner. Res.* 21: 993-1002
- Barber, M. C., Price N. T. and Travers M. T. 2005. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene of metazoan. *Biochim. Biophys. Acta.* 1733: 1-28
- Barnes, K. M., Winslow N. R., Shelton A. G., Hlusko K. C. and Azain M. J. 2012. Effect of dietary conjugated linoleic acid on marbling and intramuscular adipocytes in pork. *J. Anim. Sci.* 90: 1142-1149
- Benson, S. C., Pershadsingh H. A., Ho C. I., Chittiboyina A., Desai P., Pravenec M., Qi N., Wang J., Avery M. A. and Kurtz T. W. 2004. Identification of telmisartan as unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 43: 993-1002
- Berg, D. K., Li C., Asher G., Wells D. N. and Oback B. 2007. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol. Reprod.* 77: 384-394
- Berkes, C. A. and Tapscott S. J. 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:585-595
- Bhat, Z. and Fayaz H. 2011. Prospectus of cultured meat – advancing meat alternatives. *J. Food Sci. Technol.* 48: 125-140

- Bianchi G., Banfi A., Mastrogiacomo M., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R. and Quarto R. 2003. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res.* 287: 98-105
- Bonab, M. M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S. H., Ghavamzedah A. and Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 7:14
- Bonala, S., Lokireddy S., Arigela H., Teng S., Wahli W., Sharma M., McFarlane C. and Kambadur R. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ induces myogenesis by modulating myostatin activity. *J. Biol. Chem.* 287: 12935-12951
- Bosch, P., Pratt S. L. and Stice S. L. 2006. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol. Reprod.* 74: 46-57
- Bosnakovski, D., Mizuno M., Kim G., Takagi S., Okumura M. and Fujinaga, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell. Tissue Res.* 319:243-253
- Brandebourg, T. D. and Hu C. Y. 2005. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. *J. Anim. Sci.* 83: 2096-2105
- Chen T., Zhou Y. and Tan W. S. 2009. Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 25:573-586
- Cheng, H., Qiu L., Ma., Zhang H., Cheng M., Li W., Zhao X. and Liu K. 2011. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Mol. Biol. Rep.* 38: 5161-5168
- Colter, D. C., Class R., DiGirolamo C. M. and Prockop D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 97:3213-3218

- Colleoni, S., Donofrio G., Lagutina I., Duchi R., Galli C. and Lazzari, G. 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning and Stem Cells*. 7:154-166.
- Colleoni, S., Bottani E., Tessaro I., Mari G., Merlo B., Romagnoli N., Spadari A., Galli C. and Lazzari G. 2009. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet. Res. Commun*. 33: 811-821
- Comite, P., Cobianchi L., Avanzini M. A., Zonta S., Mantelli M., Achille V., De Martino M., Cansolino L., Ferrari C., Maccario R., Gandolfo G. M., Dionigi P., Locatelli F. and M. E Bernardo. 2010. Isolation and ex vivo expansion of bone marrow-derived porcine mesenchymal stromal cells: potential for application in an experimental model of solid organ transplantation in large animals. *Transplant. Proc*. 42: 1341-1343
- Costa Cdos, S., Rohden F., Hammes T. O., Margis R., Bortolotto J. W., Padoin A. V., Mottin C. C. and Guaragna R. M. 2011. Resveratrol upregulates SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPAR γ 1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. *Obes. Surg*. 21: 356-361
- Cramer C., Freisinger E., Jones R. K., Slakey D. P., Dupin C. L., Newsome E. R., Alt E. U. and Izadpanah R. 2010. Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 19: 1875-1884
- Crossno, J. T. Jr., Majka S. M., Grazia T., Gill R. G. and Klemm D. J. 2006. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow –derived circulating progenitor cells. *J. Clin. Invest*. 116: 3220-3228
- Dezawa, M., Ishikawa H., Itokazu Y., Yoshihara T., Hoshino M., Takeda S., Ide C., and Nabeshima Y. 2005. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 309:314-317

- Dhanasekaran, M., Indumathi D., Lissa R. P., Harikrishnan R., Rajkumar J. S. and Sudarsanam D. 2013. A comprehensive study on optimization of proliferation and differentiation potency of bone marrow derived mesenchymal stem cells under prolonged culture condition. *Cytotechnology* 65: 187-197
- Drost, A.C., Weng S., Feil G., Schäfer J., Baumann S., Kanz L., Sievert K. D., Stenzl A. and Möhle R. 2009. In vitro myogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for urethral sphincter muscle repair. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1176:135-43.
- Erbe, D.V., Gartrell K., Zhang Y. L., Suri V., Kirincich S. J., Will S., Perreault M., Wang S. and Tobin J. F. 2006. Molecular activation of PPARgamma by angiotensin II type 1-receptor antagonists. *Vascul. Pharmacol.* 45:154-162
- Eslaminejad, M. B., Falahi F., Nazarian H., Taghiyar L., and Daneshzadeh M.T. 2007. Differentiation potential and culture requirements of mesenchymal stem cells from ovine bone marrow for tissue regeneration applications. *Iranian J. Vet. Surg.* 2: 53-65
- Forte, G., Minieri M., Cossa P., Antenucci D., Sala M., Gnocchi V., Fiaccavento R., Carotenuto F., De Vito P., Baldini P. M., Prat M. and Di Nardo P. 2006. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration and differentiation. *Stem Cells* 4: 23-33
- Foufelle, F., Girard G. and Ferré P. 1996. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Adv. Enzyme Regul.* 36: 199-226
- Furukawa, H., Mawatari K., Yasui S., Morizumi R., Shimohata T., Harada N., Takahashi A. and Nakaya Y. 2011. Telmisartan increases localization of glucose transporter 4 to the plasma membrane and increases glucose uptake via peroxisome proliferator-activated receptor γ in 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 660: 485-491

- Gang, E. J., Jeong J. A., Hong S. H., Hwang S. H., Kim S. W., Yang I. H., Ahn C., Han H. and Kim H. 2004. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 22:617-624
- Gaudel, C., Schwartz C., Giordano C., Abumrad N. A. and Grimaldi P.A. 2008. Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: E297-E304
- Gekas, J., Walther G., Skuk D., Bujold E., Harvey I. and Bertrand O. F. 2010. In vitro and in vivo study of human amniotic fluid-derived stem cell differentiation into myogenic lineage. *Clin. Exp. Med.* 10: 1-6
- Gianakopoulos, P. J., Mehta V., Voronova A., Cao Y., Yao Z., Coutu J., Wang X., Waddington M. S., Tapscott S. J. and Skerjanc I. S. 2011. MyoD directly up-regulates premyogenic mesoderm factors during induction of skeletal myogenesis in stem cells. *J. Biol. Chem.* 286: 2517-2525
- Goldenberg, I., Benderly M. and Gouldbourt U. 2008. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc. Health Risk Manag.* 4: 131-141
- Hausman, G. J., Poulos S. P., Pringle T. D. and Azain M. J. 2008. The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. *J. Anim. Sci.* 86(14 Suppl): E236-E243
- He, H., Yang D., Ma L., Luo Z., Ma S., Feng X., Cao T., Yan Z., Liu D., Tepel M. and Zhu Z. 2010. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension.* 55: 869-879

- Hou, J. F., Zhang H., Yuan X., Li J., Wie Y. J. and Hu S. S. 2008. In vitro effects of low-level laser radiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors and myogenic differentiation. *Lasers Surg. Med.* 40: 726-733
- Huo, Y., Guo X., Li X., Xu H., Halim V., Zhang W., Wang H, Fan Y. Y., Ong K. T., Woo S. L., Chapkin R. S., Mashek D. G., Chen Y., Dong H., Lu F., Wei L., Wu C. 2012. Targeted overexpression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in adipose tissue increase fat deposition but protects against diet induced insulin resistance and inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* 287: 21492-21500
- Izadpanah, R., Joswig T., Tsien F., Dufour J., Kirijian J. C. and Bunnell B. A. 2005. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev.* 14: 440-451
- Jang, G., Hong S. G. and Lee B. C. 2011. Cloned calves derived from somatic cell nuclear transfer embryos cultured in chemically defined medium or modified synthetic oviduct fluid. *J. Vet. Sci.* 12: 83-89
- Jiang, S., Wang W., Miner J. and Fromm M. 2012. Cross regulation of sirtuin 1, AMPK, and PPAR γ in conjugated linoleic acid treated adipocytes. *PLoS One* 7: e48874
- Jin, X., Kim J. G., Oh M. J., Sohn Y. W., Pian X., Yin J. L., Beck S., Lee N., Son J., Kim H., Yan C., Wang J. H., Choi Y. J. and Whang K. Y. 2007. Opposite roles of MRF4 and MyoD in cell proliferation and myogenic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 476-482
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel B., Gomès D., Rocancourt D., Buckingham M., Shinin V. and Tajbakhsh S. 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature.* 431: 466-471
- Khatri, M., O'Brien T. D. and Sharma J. M. 2009. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev.* 18: 1485-1492

- Kretlow, J. D., Jin Y. Q., Liu W., Zhang W. J., Hong T. H., Zhou G., Baggett L. S., Mikos A. G. and Cao Y. 2008. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol.* 9:60
- Lass A., Zimmermann R., Oberer M. and Zechner R. 2011. Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 50: 14-27
- Langelaan, M. L. P., Boonen K. J. M, Polak R. B., Post M. J., and van der Dchaft D. W. J. 2010. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends Food Sci. Tech.* 21: 59-66
- Lo T., Ho J. H., Yang M. H. and Lee O. K. 2011. Glucose reduction prevents replicative senescence and increase mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 20: 813-825
- Lopes, P. A., Martins S. V., Pinho M. S., Alfaia C. M., Fontes C. M., Rodrigues P. O., Morais G. S., Castro M. F., Pinto R. and Prates J. A. 2008. Diet supplementation with the cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocyte in Wistar rats. *Nutr. Res.* 28: 480-486
- McCarty, R. C., Gronthos S., Zannettino A. C., Foster B. K. and Xian C. J. 2009. Characterization and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 219: 324-333
- Mironov, V., Trusk T., Kasyanov V., Little S., Swaja R. and Markwald R. 2009. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication* 1: 022001
- Moscato, I., Centeno A., López E., Rodriguez-Barbosa J. I., Santamarina I, Filgueira P., Sánchez M.J., Domínguez-Perles R., Peñuelas-Rivas G. and Domenech N. 2005. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc.* 37:481-482.

- Ninomiya, Y., Sugahara-Yamashita Y., Nakachi Y., Tokuzawa Y., Okazaki Y. and Nishiyama M. 2010. Development of rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394: 303-308
- Oberfield, J. L., Collins J. L., Holmes C. P., Goreham D. M., Cooper J. P., Cobb J. E., Lenhard J. M., Hull-Ryde E. A., Mohr C. P., Blanchard S. G., Parks D. J., Moore L. B., Lehman J. M., Plunket K., Miller A. B., Milburn M. V., Kliewer S. A. and Willson T. M. 1999. A peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 6102, 6106.
- Picard, F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M. W. and Guerente L. 2004. Sirt 1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* 429: 771-776
- Platt, I. D. and El-Soheby A. 2009. Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem.* 20: 956-964
- Rallapalli S., Bishi D. K., Verma R. S., Cherian K. M. and Guhathakurta S. 2009. A multiplex PCR technique to characterize human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett.* 31: 1843-1850
- Rhodes N. P., Srivastava J. K., Smith R. F. and Longinotti C. 2004. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15: 397-402.
- Schallmoser, K., Bartmann C., Rohde E., Bork S., Guelly C., Obenauf A. C., Reinisch A., Horn P., Ho A. D., Strunk D. and Wagner W. 2010. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica.* 95: 867-874

- Shan, T. Z. Ren Y., Wu T., Liu C. X. and Wang Y. Z. 2009. Regulatory role of Sirt1 on the gene expression of fatty acid-binding protein 3 in cultured porcine adipocytes. *J. Cell. Biochem.* 107: 984-991
- Shang, Y. C., Wang S. H., Xiong F., Zhao C. P., Peng F. N., Feng S. W., Li M. S., Li Y. and Zhang C. 2007. Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 28: 1761-1774
- Shiota, M., Heike T., Haruyama M., Baba S., Tsuchiya A., Fujino H., Kobayashi H., Kato T., Umeda K., Yoshimoto M., Nakahata T. 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Exp. Cell Res.* 313:1008-1023
- Shockley, K. R., Lazarenko O. P., Czernik P. J., Rosen C. J., Churchill G. A. and Lecka-Czernik B. 2009. PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 106: 232-246
- Schnapp, E., Pistocchi A. S., Karampetsou E., Foglia E., Lamia C. L., Cotelli F. and Cossu G. 2009. Induced early expression of mrf4 but not myog rescues myogenesis in the myod/myf5 double-morphant zebrafish embryo. *J. Cell. Sci.* 122:481-488
- Tagami, T., Yamamoto H., Moriyama K., Sawai K., Usui T., Shimatsu A. and Naruse M. 2009. A selective peroxisome proliferator activated receptor-gamma modulator, telmisartan, binds to the receptor in a different fashion from thiazolidinediones. *Endocrinology.* 150: 862-870
- Tenenbaum, A. and Fisman E. Z. 2012. Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc. Diabetol.* 11: 140

- Vidal, M. A., Kilroy G.E., Johnson J. R., Lopez M. J., Moore R. M. and Gimble J. M. 2006. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet. Surg.* 35:601–610.
- Vidal, M. A., Walker N. J., Napoli E. and Borjesson D. L. 2012. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev.* 21: 273-283
- Visioli, F., Giordano E., Nicod N. M. and Dávalos A. 2012. Molecular targets of omega 3 and conjugated linoleic acids – micromanaging” cellular response. *Front Physiol.* 3: 42
- Wagner, W., Bork S., Horn P., Kronic D., Walenda T., Diehlman A., Benes V., Blake J., Huber F., Eckstein V., Boukamp P. and Ho A. 2009. Aging and replicative senescence have related effect on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 4: e5846
- Williams J. B., Shin T., Liu L., Flores-Foxworth G., Romano J., Blue-McClendon A., Kraemer D. and Westhusin M. E. 2006. Cloning of exotic/endangered species: desert bighorn sheep. *Methods Mol. Biol.* 348: 169-182
- Xynos, A., Corbella P., Belmonte N., Zini R., Manfredini R. and Ferrari G. 2010. Bone marrow derived hematopoietic cells undergo myogenic differentiation following a Pax-7 independent pathway. *Stem Cells.* 28: 965-963
- Zeng, L., E. Rahrman, Q. Hu, T. Lund, L. Sanquist, M. Felten, T. D. O'Brien, J. Zhang and C. Verfaillie. 2006. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells* 24:2355-2366
- Zhang, Y., Chu Y., Shen W. and Dou Z. 2009. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells toward cardiomyocyte-like cells. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 9: 943-946

- Zhou, X., Li D., Yin J., Ni J., Dong B., Zhang J. and Du M. 2007. CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J. Lipid Res.* 48: 1701-1709
- Zhou, X. R., Sun C. H., Liu J. R. and Zhao D. 2008. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR gamma gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. *Growth Horm. IGF Res.* 18: 361-368
- Zimmerman S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C. F. and Martens U. M. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17: 1146-1149