UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Establecimiento de un Sistema de Cultivo de Células Mesenquimales de Cerdo y su Diferenciación hacia Células Adiposas y Musculares

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:
R O S A M A R T H A P É R E Z S E R R A N O

Director de Tesis:
Dra. María Ofelia Mora Izaguirre
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Querétaro, Qro. Agosto 2016

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

INDICE

RESUMEN 1
ANTECEDENTES 2
Células Troncales Mesenquimales (MSC) 2
Multipotencialidad 2
Adipogénesis 3
Modelo de inducción adiposa 5
Uso de compuestos para modular la adipogénesis 5
Efecto de los agonistas de PPARγ sobre el metabolismo energético en adipocitos 7
Miogénesis 8
Modelo de inducción muscular 10
Uso de compuestos para modular la miogénesis 11
Efecto de los agonistas de PPARβ/δ sobre el metabolismo energético en miocitos 12
HIPOTESIS 13
OBJETIVO GENERAL 13
OBJETIVOS PARTICULARES 13
MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS 14
DISCUSIÓN 35
1. Establecimiento de un sistema de cultivo primario de MSC de la médula ósea de cerdos 35
2. Inducir la diferenciación hacia los linajes muscular y adiposo y 3. Medir la expresión de los factores de transcripción PPARγ (adipogénesis) y myod1 o cadena pesada de miosina (MYHC) (miogénesis) mediante 2-ΔΔct. 36
4. Promover la adipogénesis y miogénesis mediante el uso de agonistas de PPARs, determinando el efecto sobre el metabolismo energético en ambos tipos celulares. 37
CONCLUSIÓN 41
LITERATURA CITADA 42
ANEXO 1 53
Células Troncales Mesenquimales: Biología, Caracterización y Futuras Aplicaciones en Salud y Producción de Especies Pecuarias. Parte I 54
Células Troncales Mesenquimales: Biología, Caracterización y Futuras Aplicaciones en Salud y Producción de Especies Pecuarias. Parte II 66

RESUMEN

La presente investigación está enfocada en ofrecer herramientas biotecnológicas que permitan la manipulación con base celular y molecular de los tejidos involucrados en las características de la canal del cerdo, mediante el uso de compuestos agonistas de los PPARs que promuevan la miogénesis y adipogénesis a partir de células troncales mesenquimales (MSC). Las células se aislaron de la médula ósea de cerdos neonatos de 0-2 días. La población celular expresó Oct, Nanog, CD90, CD44, CD45 y ABCG2, considerados como marcadores de MSC. La capacidad proliferativa se determinó mediante curvas de crecimiento celular durante 15 subcultivos registrándose una duración de 48 días, con un registró un total de células de 28.2×10^6 ($P \leq 0.0001$). Se probaron protocolos de inducción adiposa y muscular para conocer el medio y el pasaje que promoviera el mayor grado de diferenciación. Se utilizó como marcador de diferenciación a PPARγ y MYHC para la adipogénesis y miogénesis, respectivamente, mediante qPCR. Posteriormente, para la adipogénesis, se probó la rosiglitazona a 1, 10 y 30μM, el ácido linoleico conjugado (ALC) a 12.5, 25 y 50μM (isomeros 9′, 11′ y 10′ 12') y el telmisartán a 5, 10 y 20μM. El ligando que promovió un aumento en los niveles de expresión de PPARγ fue el ALC 9′ 11′ a dosis dependiente ($P < 0.0001$), seguido por telmisartán a 10μM ($P \leq 0.0001$). Para el caso de la miogénesis fueron probados el bezafibrato a 100, 200 y 400 μM, telmisartán a 5, 10 y 20μM, ALC 12.5, 25 y 50μM (isómero 10′ 12') y L165 a 10, 20 y 40μM. El ligando que aumentó la expresión de MYHC fue el ALC 10′ 12′ en la dosis de 50μM ($P \leq 0.0001$), seguido por el bezafibrato dosis 200 μM ($P \leq 0.0001$) y el L165 en sus dosis de 10 y 20μM ($P \leq 0.0001$). El efecto en el metabolismo energético del ALC 9'11' en la adipogenesis fue un aumentó en la expresión de la HX2, ATGL, LPL, ACCAa y G6PD ($P \leq 0.05$), pero disminuyó la PFK y ACCAa ($P \leq 0.05$). En el caso del ALC 10′12′ 50μM sobre la miogenesis, se registró un aumento para la PFK, ACCAb, CPT1b, G6PD ($P \leq 0.05$) y no existió cambios para la HX2 y ACCAa ($P \geq 0.05$).

ANTECEDENTES

La producción pecuaria nacional en el transcurso de los últimos diez años experimento una tasa media de crecimiento anual (TMCA) de 2.9%, siendo las aves, los bovinos y los porcinos, las especies que representan el 97.5 % de la carne en el país. En el caso de la porcicultura, en la última década tuvo un TMCA de 2.0% registrando una oferta de 101,806 miles de toneladas.

Este sector pecuario es altamente tecnificado, sin embargo, existen áreas de oportunidad que por medio de la ciencia pueden ofrecer herramientas que permitan optimizar la producción. Una de las áreas de investigación que está siendo estudiada es la modificación de las características de la canal a partir de la manipulación molecular y celular del tejido adiposo y muscular (tejidos involucrados directamente en la canal) a partir de las células troncales mesenquimales, precursoras de la adipogénesis y miogénesis, con el objetivo de manipular los genes involucrados en dichos procesos modificando la diferenciación celular y orientando el metabolismo energético, para mejorar las características de la canal.

Células Troncales Mesenquimales (MSC)

Las MSC poseen características que las convierten en un modelo único para la investigación en el área biomédica. Su empleo como herramienta biotecnológica permite soluciones innovadoras a 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, radicando en ello su valor para la ingeniería y reparación de tejidos, tratamiento de enfermedades y manipulación de la diferenciación celular, e incluso la producción animal donde se han estudiado para 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 tisular de las especies domésticas (Anexo 1).

Multipotencialidad

La multipotencialidad es un término que se refiere a la capacidad de diferenciarse hacia cualquier linaje celular de tipo conjuntivo. Dicha capacidad les da el valor biológico a las MSC para ser utilizadas como modelos en las investigaciones de terapia de regeneración de tejidos, estudios de organogénesis y desarrollo de biotecnología.

Existen reportes que han descrito el papel fundamental que tienen los genes Oct4, Nanog y Sox 2 para mantener el estado indiferenciado de las células, confiriéndole a las MSC la capacidad de multipotencialidad (Chambers *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003; Wang *et al.* , 2006; Ding *et al.* , 2012) y al ser insertados junto con algunos factores que modulan el ciclo celular, como c-Myc, Stat3, β-catenina, Grb2, KLF4 y TCL1, es posible reprogramar células

completamente diferenciadas (iPS) (Hewitt *et al.* , 2011; Montserrat *et al.* , 2012; Tang *et al.*, 2012).

Durante el proceso de diferenciación celular los cambios dinámicos en la expresión génica y la remodelación de la cromatina modulan la tasa y tiempo de maduración de las células. En la adipogénesis y miogénesis estos cambios han sido ampliamente documentados. (Hepperger *et al.*, 2008; Okuno *et al.*, 2013; Rozwadowska *et al.*, 2013; Albini *et al.*, 2015; Padilla-Benavides *et al.*, 2015).

Adipogénesis

El proceso de adipogénesis está dividido en dos fases, las cuales se caracterizan por presentar cambios en el perfil de expresión génica y en la remodelación de la cromatina.

1. Primera fase.

Los cambios en la expresión génica están determinados por la activación de dos isoformas de las proteínas de unión a CCAAT/ enhancer, el C/EBPβ y C/EBPδ (Cao *et al.*, 1991). Estas proteínas pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP (Basic Leucine Zipper). Una de sus características más relevantes, es la secuencia altamente conservada de 55-65 aminoácidos en el extremo carboxilo. Esta secuencia incluye el dominio bZIP, el cual consiste en una región de unión al ADN rica en aminoácidos y la cremallera de leucina compuesta por 4 o 5 repeticiones de leucinas con una conformación de α-hélice (Ramji y Foka, 2002).

Después de 24 horas de la inducción adiposa, las isoformas C/EBPβ y C/EBPδ se acumulan y las células comienzan un nuevo ciclo celular mitótico (Tang *et al.*, 2003). Esta acumulación promueve la expresión de PPARγ y C/EBPα. Posteriormente, C/EBPα es fosforilada por la ciclina D, lo que tiene un efecto supresor al detener el ciclo celular, permitiendo la segunda fase de diferenciación adiposa (Musri *et al.*, 2007).

En cuanto a los cambios epigenéticos Szczerbal *et al.* (2009) determinaron que al inicio del tratamiento GATA2, PPARγ, CEBPα/β/δ, SREBF1, FABP4 se encuentran en la periferia del núcleo como heterocromatina. Para el día 7, solo GATA2, SREBF1 y CEBPβ, se recorrieron a una zona intermedia y para el día 14, todos los genes estaban ubicados en el centro del núcleo como eucromatina. Estos cambios están relacionados con la tasa de expresión de los genes, siendo el primero en expresarse GATA2 (factor de transcripción expresado en preadipocitos). GATA2 presenta un dominio de unión al ADN con dos dedos de zinc, reconociendo las secuencias (A/T)GATA(A/G). Su función es modular cambios epigenéticos y niveles de expresión de genes durante la adipogénesis temprana (Jack y Crossley, 2010).

2. Segunda fase.

El ciclo celular es detenido y aumenta la expresión de los factores de transcripción PPARγ y C/EBPα, los cuales se regulan positivamente entre ellos, dando como resultado la activación de una amplia gama de genes que permiten la maduración del adipocito.

PPARγ pertenece a la familia de los PPARs (receptores activados por proliferadores peroxisomales), identificados como factores de transcripción dependientes de ligando y son parte de la superfamilia de receptores nucleares (Takada *et al.*, 2009).

Los receptores nucleares están caracterizados por presentar 5 regiones en su estructura, el dominio de unión al ADN (con dos dedos de Zinc), la región AF1, el dominio de unión al ligando (LBD), la región AF2 y la bisagra (Poulsen *et al.*, 2012). En la actualidad se han determinado tres isoformas de los PPARs, α/β/γ (Seok y Cha, 2013).

PPARα modula la captación y oxidación de los ácidos grasos y controla el metabolismo de las lipoproteínas. Su activación reduce los niveles de triglicéridos e incrementa las lipoproteínas de alta densidad en la sangre (Contreras *et al.*, 2013). Controla la adaptación metabólica especialmente en el desbalance energético, al manejar la energía modulando la expresión de genes relacionados con la oxidación de las grasas (Xie *et al.*, 2015). Se expresa principalmente en hígado, riñón, corazón, músculo esquelético y cerebro.

PPARβ también identificado como PPARδ, controla la homeostasis de la glucosa, inhibe la salida de la glucosa hepática y aumenta la oxidación de ácidos grasos a partir de tejido adiposo y muscular (Germain *et al.*, 2006). Se expresa en cerebro, tejido adiposo, músculo, hígado, células β pancreáticas, células de la musculatura lisa vascular y endotelio.

PPARγ es considerado como el gen clave en el proceso de adipogénesis por ser el modulador en la expresión de los genes propios del adipocito, por ejemplo; aP2/FABP4, acil CoA sintetasa, proteína transportadora de ácidos grasos y lipoproteína lipasa, entre otros. También controla la expresión de adipocitocinas como leptina y TNFα (Rogue *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010). Para la transcripción de PPARγ, el mapeo genético muestra que el gen ch3p25 es transcrito a cuatro mRNA y mediante splicing alternativo da como resultado 2 isotipos PPARγ1 y PPARγ2. El primero es expresado ubicuamente y el segundo exclusivamente en el tejido adiposo (Luconi *et al.*, 2010).

Los PPARs se activan cuando el ligando se une en el LBD. Esta unión cambia de conformación al receptor formando una hendidura hidropónica en la hélice 12, el cual es el sitio de interacción con los motif LXXLL de los coactivadores. En ausencia de ligando, el dominio LBD se encuentra en conformación inactiva interactuando con motifs de los correpresores (Poulsen *et al.*, 2012). Los PPARs forman heterodímeros con miembros de la familia de receptores X de retinoides (RXR) para unirse al ADN. El cambio conformacional de los dos receptores, permite la unión y reconocimiento de los elementos de respuesta del proliferador de peroxisoma (PPRE) (secuencias AGGTCA, espaciados por un nucleótido) en los promotores de los genes blanco (Chandra *et al.*, 2008).

Modelo de inducción adiposa

Se han descrito diversos modelos de inducción adiposa basados en sincronizar el crecimiento celular. Esto consiste en detener el ciclo e inducir una o dos rondas de división mitótica, conocida como expansión clonal (Rosen *et al.,* 2000). Lo anterior se realiza al adicionar un agente que eleva el AMPc dentro de la célula (3- isobutil-1-metilxantina IBMX), un glucocorticoide (dexametasona) e insulina (Ramji y Foka, 2002).

Este cambio metabólico sincroniza las células para entrar a un ciclo nuevo de mitosis donde es expresado C/EBPβ y C/EBPδ en respuesta a la elevación del AMPc y al glucocorticoide, respectivamente (Cao *et al.,* 1991). El promotor de C/EBPα es reconocido por el heterodímero de C/EBPβ-C/EBPδ. Cuando estos se acumulan, comienza la transcripción de C/EBPα y PPARγ. Posteriormente, en respuesta a la tasa metabólica alta de glucólisis, se promueve un acúmulo de triglicéridos lo que permite madurar al preadipocito (Poulsen *et al.,* 2012).

Uso de compuestos para modular la adipogénesis

Existen en la literatura reportes de varios compuestos que modulan la adipogénesis. Tres ejemplos de estos son: el ácido linoleico conjugado (natural) (Rosen *et al.,* 2000), las tiazolidinedionas (sintético) (Houseknecht *et al.,* 2002) y el Telmisartán (sintético).

1-Ácido linoleico conjugado

El ácido linoleico conjugado (ALC) es una mezcla compleja de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico. El ALC está constituido por 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces (posición cis o trans) (Cordero *et al.,* 2011). Las mezclas del ACL contienen principalmente dos isómeros con actividad biológica; el 9´cis 11´trans y el 10´cis 12´trans, figura 1.

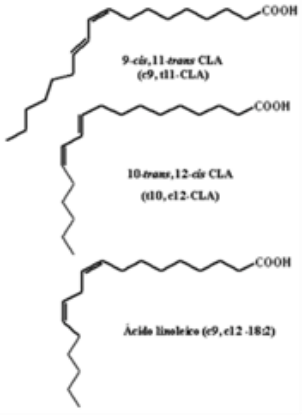


Figura 1. Isómeros del ácido linoleico.

Los resultados *in vitro* han descrito que el 9´cis 11´trans, promueve la diferenciación adiposa en concentraciones de 25µM - 50µM, registrando un aumento (~21-28%) en la cuantificación de rojo oleoso para las células tratadas, así como un aumento en los niveles de expresión de FABP4 pero disminución de PPARγ (Brandebourg y Hu, 2005; Platt y El-Sohemy, 2009). Para el caso del isómero 10´cis 12´trans se ha comprobado que inhibe la adipogénesis disminuyendo los niveles de expresión de PPARγ, SREBP-1c y CEBPα (Brandebourg y Hu, 2005; Zhai *et al.*, 2010). Los experimentos donde se utiliza el ALC combinado muestran una tendencia de disminución en el porcentaje de la adipogénesis (Pérez-Matute *et al.*, 2007; Belda *et al.*, 2012).

2-Tiazolidinedionas (TZD)

Las TZD son comúnmente utilizadas como ligandos de PPARs, siendo la más estudiada la rosiglitazona. Wang *et al.* (2011) probaron 0.1, 1, 10 y 30 µM de rosiglitazona, siendo las dosis de 10 a 30 µM las de mayor efecto adipogénico.

Se ha reportado que cuando se adiciona rosiglitazona al medio de cultivo, el tiempo de diferenciación (2-3 semanas) se disminuye a 7-8 días, este efecto es asociado a la acción sinérgica de la dexametasona, la insulina y el IBMX con la rosiglitazona (Ninomiya *et al.*, 2010). Singh *et al.* (2007) lograron transdiferenciar mioblastos porcinos a adipocitos mediante ciglitazona a una concentración de 10 µM, obteniendo células con genotipo y fenotipo adiposo.

3- Telmisartán

El telmisartán es un agonista parcial de la familia de los PPARs, mostrando efectos pleiotrópicos como la modulación del estrés oxidativo, inhibición de la respuesta inmune y la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos (Cianchetti *et al.*, 2008).

El telmisartán es un antihipertensivo no-peptídico, antagonista de los receptores de angiotensina II (ARAII), figura 2. Existen estudios donde se ha reportado varios efectos como la regulación positiva en la expresión de UPC-1, el receptor de angiotensina II y PPARγ, así como, incrementar la adiponectina y promover el gasto energético (He *et al.*, 2010).

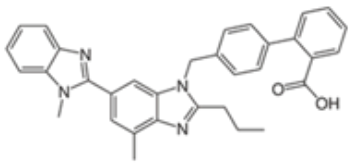


Figura 2. Estructura química del Telmisartán.

Durante la adipogénesis, el telmisartán ha demostrado modular los niveles de almacén de las gotas lipídicas en la célula atenuando el acúmulo exacerbado de triglicéridos, al actuar tanto sobre PPARγ como PPARδ en células 3T3-L1 (He *et al.*, 2010). En la investigación realizada

por Schupp *et al.* (2005) concluyeron que el telmisartán promueve la actividad de PPARγ selectivamente al reclutar distintos coactivadores. Este cambio se ve reflejado en una diferenciación adiposa con acumulación moderada de triglicéridos en comparación con la pioglitazona.

Efecto de los agonistas de PPARγ sobre el metabolismo energético en adipocitos

Existe en la literatura información sobre el efecto del uso de agonistas sobre PPARγ y los cambios en la expresión génica de las enzimas clave de las rutas metabólicas. En el cuadro 1 se describen los cambios en los niveles de expresión de hexocinasa (HX), fosfofructocinasa (PFK), acetil CoA carboxilasa alfa (ACCAa), ácido grasa sintetasa (FASN) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) durante el uso de cuatro agonistas.

Cuadro 1. Efecto de los compuestos sobre los niveles de expresión.

Compuesto agonista	Glucólisis		Lipogénesis		Vía de las pentosas	Referencia
	HX	PFK	ACCAa	FASN	G6PD	
Rosiglitazona	↑	↑	↑	↑	¿?	Festuccia *et al.*, 2009; Ribet *et al.*, 2010; Yanik *et al.*, 2011
ALC 9´11´	↑	↓	↑	↑	¿?	Brandebourg y Hu, 2005; Sakuma *et al.*, 2010
ALC 10´12´	↓	↓	↓	↓	¿?	Brown *et al.*, 2003; Brandebourg y Hu, 2005
Telmisartán	↑	↑	—↑	—↑	¿?	He *et al.*, 2010; Furukawa *et al.*, 2011

Cuando se utiliza rosiglitazona la expresión de la HX, PFK, ACCAa y FASN aumentan considerablemente (Festuccia *et al.*, 2009; Rubet *et al.*, 2010). Se ha reportado ampliamente que la rosiglitazona es un compuesto proadipogénico que permite la acumulación exacerbada de triglicéridos (Yanik *et al.*, 2011).

En el caso del ALC existen reportes contradictorios dependiendo del isómero utilizado. Para el caso del ALC 9´cis 11´trans promueve un aumento en la expresión de HX, ACCAa y FASN pero no para la PFK, por lo que se considera un agonista que permite el acúmulo moderado de triglicéridos en los adipocitos maduros (Brandebourg y Hu, 2006; Sakuma *et al.*, 2010). Los resultados reportados para el ALC 10´cis 12´trans indican una regulación a la baja en los niveles de expresión de HX, PFK, ACCAa, FASN lo que corrobora el efecto inhibitorio del compuesto sobre la diferenciación adiposa (Brown *et al.*, 2003; Brandebourg y Hu, 2005).

Por último, el telmisartán aumenta la expresión de HX, PFK pero no la ACCAa y la FASN (He *et al.*, 2010; Furukawa *et al.*, 2011). Se ha descrito a este compuesto como un agonista parcial de PPARγ lo que se refleja en una diferenciación adiposa baja con acúmulo moderado de triglicéridos por su efecto sobre PPARδ, definiéndolo como un fármaco que mantiene una tasa elevada de recambio de triglicéridos (He *et al.*, 2010).

En cuanto a los efectos sobre la expresión de G6DP no se encontraron referencias para ninguno de los compuestos.

Miogénesis

El proceso está dividido en tres fases; determinación, proliferación y maduración. La primera y segunda fase se lleva a cabo durante la embriogénesis, donde los mioblastos se originan y proliferan en las somitas para posteriormente migrar a los miembros en desarrollo (Lodish *et al.*, 2004).

En la fase de maduración, los mioblastos se mantienen en un estado quinecente, al expresar pax7, conservando el estado comprometido de la célula sin continuar con el proceso de maduración (Wen *et al.*, 2012). Pax7 es un factor de transcripción clave para la supervivencia, capacidad de autorrenovación y regulación de la miogénesis por su interacción con los factores regulatorios miogénicos (MRFs) (Olguín y Pisconti, 2012).

La fase de maduración está regulada por la familia de MRFs como Myf5, MyoD1, miogenina y MRF4 (Gang *et al.*, 2004). Los MRFs pertenecen a la familia hélice-bucle-hélice (bHLH) de los factores de transcripción con dominio de unión al ADN. Este tipo de factores de transcripción se caracterizan por presentar dos regiones importantes; la región básica (B) (sitio de unión al ADN), la región bHLH (sitio de formación de homo/hetero dímeros). En ambos extremos de las dos regiones se localizan zonas de transactivación. Los homodímeros o heterodímeros reconocen un sitio de ADN de 6 pares de bases con una secuencia consenso CANNTG (N= cualquier nucleótido) nombrada como caja E (Lodish *et al.*, 2004).

La especificidad de las proteínas MRFs se debe al tipo de heterodímeros formados entre una proteína conocida como E2A (proteína bHLH), donde se ha comprobado que MyoD1 unido a E2A tienen 10 veces más afinidad para unirse a la caja E que como homodímero (Lodish *et al.*, 2004).

La expresión de E2A no es específica del musculo y es insuficiente para conferir especificidad muscular, sin embargo, existen experimentos que han determinado que los heterodímeros entre MRFs-E2A permiten el reconocimiento de otro grupo de proteínas conocidas como factores de amplificación de miocitos (MEF). Los MEF pertenecen a la familia de MADS de factores de transcripción. Se caracterizan por presentar una región adyacente al dominio MADS que reconoce a los MRFs. Se ha determinado una acción sinérgica entre el homodímero de MEF y el heterodímero de MRFs-E2A que potencializan la expresión de los genes característicos de los miocitos (Lodish *et al.*, 2004).

La expresión de los MRFs y su posterior control sobre los genes característicos del miocito está condicionado al libre acceso al ADN, demostrando que los cambios epigenéticos durante la miogénesis modulan la tasa de diferenciación. La remodelación de la cromatina es básica para permitir el acceso a la caja E, estos cambios han sido asociados a Swi/Snf (complejo

proteico con actividad ATPasa y posiblemente helicasa) y su función principal es reclutar a las acetilasas de histonas con el objetivo de aumentar la permeabilidad al ADN (Lodish *et al.,* 2004).

También el metabolismo energético de la célula controla la tasa de diferenciación, situación en la que toma relevancia la familia de los PPRAs, los cuales modulan la homeostasis de la glucosa y la oxidación y transporte de ácidos grasos (Germain *et al.,* 2006; Sanhueza y Valenzuela, 2006; Costa *et al.,* 2010; Rogue *et al.,* 2010).

La isoforma PPARβ/δ ha sido reportada como un modulador clave de la homeostasis energética del musculo. En el trabajo de Luquet et al. (2003) sobre expresaron PPARβ/δ en ratones transgénicos reportando un incremento en el número de fibras (1.72 veces) en el músculo tibial anterior, así como un incremento de las capacidades oxidativas. También aumentó la expresión de la proteína desacoplante 2 (UCP2) y la proteína de unión de los ácidos grasos del corazón (h-FABP).

El efecto de incrementar la capacidad oxidativa contribuye a manipular el acúmulo de grasa en el organismo y mejorar la resistencia al ejercicio (Wang *et al.,* 2004). Lo anterior fue comprobado por Schuler *et al.* (2006) donde trabajaron con ratones transgénicos (PPARβ/δ constitutivamente activo) y observaron que estos disminuyeron el porcentaje de grasa corporal en comparación con ratones silvestres que fueron obesos, mientras que los ratones knockout disminuyeron en la capacidad oxidativa y fueron más propensos a la obesidad. Estas respuestas se obtuvieron cuando se alimentaron los tres grupos experimentales con dietas altas en grasa. Estos resultados demuestran que PPARβ/δ es fundamental en los miocitos para el cambio de fibras glucoliticas a oxidativas. Este mecanismo se asocia a la expresión de PGC1α, el cual presenta elementos de respuesta a PPARβ/δ y una de sus funciones primordiales es modular la biogénesis mitocondrial.

El papel importante que juega PPARβ/δ en el proceso de la miogénesis también fue corroborado por Bonala *et al.* (2012) donde determinaron que al manipular la expresión de PPARβ/δ mediante el uso de agonistas, como el L165041, se incrementaba la proliferación y diferenciación de los mioblastos. Estos datos revelaron que PPARβ/δ es un regulador positivo de la miogénesis y que funciona a través de la modulación negativa de la actividad de miostatina.

También PPARβ/δ modula la miogénesis mediante la expresión de FoxO1, datos demostrados por Angione *et al.* (2011) donde observaron que al tener ratones PPARβ/δ knockout los niveles de expresión de FoxO1 fueron bajos, reduciendo la capacidad de regeneración muscular después de una lesión. La expresión de FoxO1 está asociada al proceso de miogénesis y fusión de los miocitos en diferenciación (Bois *et al.,* 2003).

Modelo de inducción muscular

Para promover la diferenciación muscular a partir de las MSC se han reportado dos compuestos principalmente 1) la 5-azacitidina y 2) la hidrocortisona.

1-5-azacitidina

La 5-azacitidina es un análogo de la citidina (figura 3). Su efecto biológico es inducir a la desmetilación del ADN resultando en cambios epigenéticos que modulan los niveles de expresión génica.

Citidina 5-azacitidina

Figura 3. Estructura química de los nucleósidos citidina y 5-azacitidina.

Durante la duplicación celular, la azacitidina es utilizada para la síntesis de novo de la cadena de ADN, siendo reconocida por la ADN polimerasa como análoga de la citosina. Posteriormente se bloquea la ADN metiltransferasa revirtiendo la hipermetilación en las islas CpG, borrando la memoria celular y permitiendo la diferenciación muscular (Stresemann y Lyko, 2008).

Moscoso *et al.* (2005) utilizaron un medio de DMEM con 10% de suero fetal ovino inactivado con antibióticos durante 24h con 10µmol/L de 5-azacitidina, confirmando la miogénesis mediante la caracterización inmunocitoquímica de α-actina y troponina-T. Estos datos fueron confirmados por Kumar *et al.* (2012) donde diferenciaron cardiomiocitos a partir de células troncales de la medula ósea, al tratarlas por 24, 72 y 168 horas con 10 mmol/L de 5-azacitidina. Los resultados mostraron que desde la exposición más corta se obtuvo células positivas a desmina, α-actina y troponina-T.

2-Hidrocortisona

La hidrocortisona es un glucocorticoide (figura 4). Su mecanismo de acción implica la difusión pasiva a través de la membrana celular para ser reconocido por el receptor a glucocorticoides (GRE), los cuales pertenecen a la familia de receptores nucleares. En ausencia de la hidrocortisona, los GRE se encuentran acoplados con tres proteínas (hsp 90, 70 y 56) formando heterocomplejos en el citoplasma. Posterior a la unión con la hidrocortisona, se libera la hsp90 y el complejo migra al núcleo donde puede actuar como monómero o homodímero, lo que permite identificar a los elementos de respuesta a los

receptores de glucocorticoides (GREs) en el ADN y modular la expresión de una gran variedad de genes (Calvar *et al.,* 1997; Lodish *et al.,* 2004).

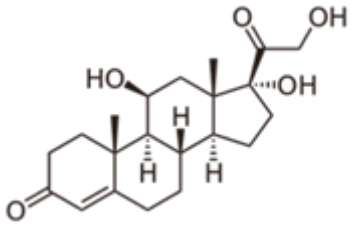


Figura 4. Estructura química de la hidrocortisona.

En un experimento se utilizó la hidrocortisona para inducir la diferenciación muscular durante 6 semanas, obteniendo células positivas por FACS para MyoD1, miogenina y cadena pesada de miosina (MYHC) (Gang *et al.,* 2004). Al hacer una revisión de literatura, no se encontraron investigaciones similares que expliquen el mecanismo de acción dentro la miogénesis.

Uso de compuestos para modular la miogénesis

Para manipular el proceso de miogénesis se han utilizado agonistas de los PPAR como el bezafibrato (sintético), L165 (natural) y telmisartán (sintético).

1- Bezafibrato

Los fibratos son agentes derivados del ácido clorofenoxiisobutírico (Fernández y Hernández, 2012), el fenofibrato, bezafibrato y gemfibrocilo son los más estudiados. Los fibratos actúan como activadores de los PPARs (principalmente de las isoformas α y β/δ) (Djouadi *et al.,* 2003). El efecto más reportado es la capacidad hipolipemiante (Cabrero *et al.,* 2000). Son utilizados para manipular el metabolismo de lípidos y glúcidos (Gavish *et al.,* 2000; Tanaka *et al.,* 2003; Bonnefon *et al.,* 2004; Laforêt y Vianey-Saban, 2010).

2- L165

El L165 es un derivado del ácido graso fenoxiacético y es considerado como agonista selectivo de PPARβ/δ. Cuando se une al LBD permite el reconocimiento de los coactivadores y la formación de heterodimeros con RXR promoviendo la transcripción de Myod o miogenina (Rogers *et al.,* 2010).

En la investigación de Son *et al.* (2001) se reportó que al utilizar L-165 en cultivos de la línea celular de miocitos L6 de ratas, se promovía la expresión de UCP3 aumentando la capacidad oxidativa de las células. Los resultados obtenidos por Bonala *et al.* (2012) muestran que al utilizar L-165 se activa PPARβ/δ promoviendo la expresión de Gasp-1 bloqueando la actividad de la miostatina (inhibidor de la diferenciación muscular) incrementando la miogénesis.

3- Telmisartán

Las pruebas experimentales han demostrado que tienen un acción sobre el PPARβ/δ previniendo la acumulación de lípidos (He *et al.,* 2010). En el trabajo de Feng *et al.* (2011) determinaron que al adicionar telmisartán en cultivos de miocitos aumentó la expresión de PPARβ/δ y AMPK en ratones silvestres en comparación con los ratones deficientes de PPARβ/δ, donde no se reportó ningún efecto. Estos resultados demostraron que la expresión de AMPK esta modulada por PPARβ/δ, siendo comprobado *in vivo,* donde se obtuvieron los mismos resultados. La activación de PPARβ/δ en el musculo, provoca cambios en el metabolismo energético, incluyendo una mayor oxidación de los ácidos grasos (Tanaka *et al.,* 2003).

Efecto de los agonistas de PPARβ/δ sobre el metabolismo energético en miocitos

Existen reportes sobre el efecto del bezafibrato y telmisartán sobre la glucólisis y lipólisis pero en el caso del ALC 10´cis 12´trans y el L165 la información es escasa o nula, cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto de los compuestos sobre los niveles de expresión.

Compuesto agonista	Glucólisis		Lipólisis		Vía de las pentosas	Referencia
	HX	PFK	ACCAb	CPT1	G6PD	
Bezafibrato	↑	↑	↑	↑	—	Gavish *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2003; Bonnefon *et al.*, 2004; Laforêt y Vianey-Saban, 2010
L165	↑	↑	¿?	¿?	¿?	Son *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2010
ALC 10´12´	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	----------
Telmisartán	↑	↑	↑	↑	¿?	Tanaka *et al.*, 2003; He *et al.*, 2010

El bezafibrato aumenta la expresión de HX, PFK, ACCAb y CPT1 pero no tiene efecto sobre la G6PD (Gavish *et al.,* 2000; Tanaka *et al.,* 2003; Bonnefon *et al.,* 2004). Estos datos corroboran el efecto hipolipemiante del compuesto (Cabrero *et al.,* 2000).

Para el caso del L165 solo existen reportes de su efecto sobre la expresión de la HX y PFK pero se desconoce los cambios en la ACCAb, CPT1 y G6PD. Dicho compuesto es denominado un agonista selectivo de PPARβ/δ y el efecto más reportado es el aumento de la capacidad oxidativa de las células (Son *et al.,* 2001).

El uso de ALC 10´cis 12´trans sobre la diferenciación muscular no ha sido previamente reportada por lo que se desconoce sus efectos sobre la glucólisis, lipólisis y ruta de las pentosas.El telmisartán aumenta la expresión de H2X, PFK, ACCAb y CPT1. Sus efectos son sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos al ser reconocido por las dos isoformas PPARγ y PPARβ/δ (Tanaka *et al.,* 2003; He *et al.,* 2010). El efecto sobre la expresión de G6PD se desconoce.

HIPOTESIS

El uso de agonistas de PPARs promoverá la diferenciación adiposa y muscular a partir de las células troncales mesenquimales y orientará el metabolismo energético de dichos tipos celulares.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de compuestos agonistas de PPARs que alteren la diferenciación celular e identificar su efecto en el metabolismo energético en células troncales mesenquimales obtenidas de la médula ósea de cerdos que serán diferenciadas hacia el linaje adiposo y muscular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un sistema de cultivo primario de MSC de la medula ósea de cerdo.

2. Inducir la diferenciación hacia los linajes adiposo y muscular.

3. Medir la expresión de los factores de transcripción PPARγ (adipogénesis) y myod1 y cadena pesada de miosina (MYHC) (miogénesis) mediante el método de la $2^{-\Delta\Delta ct}$.

4. Promover la adipogénesis y miogénesis mediante el uso de agonistas de PPARs, determinando el efecto sobre el metabolismo energético en ambos tipos celulares.

MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS

Artículo aceptado para su publicación en el Journal Cells Tissues Organs.

Original Paper

Cells Tissues Organs

Cells Tissues Organs
DOI: 10.1159/000447628

Accepted after revision: June 15, 2016
Published online: □ □ □

© S. Karger AG, Basel
PROOF Copy for personal use only
ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

PPAR Agonists Promote the Differentiation of Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Adipogenic and Myogenic Lineages

Rosa M. Pérez-Serrano[a] M. Laura González-Dávalos[b]
Carlos Lozano-Flores[c] Armando Shimada[b] Anaid Antaramian[c]
Alfredo Varela-Echavarría[c] Ofelia Mora[b]

[a]Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, and [b]Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FES-Cuautitlán), and [c]Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro City, Mexico

Key Words
Mesenchymal stem cells · Porcine bone marrow · PPAR agonists · Adipogenesis · Myogenesis

Abstract
Purpose: The aim of this work was to evaluate the effect of PPAR agonists on the differentiation and metabolic features of porcine mesenchymal stem cells induced to the adipogenic or myogenic lineages. **Methods:** Bone marrow MSCs from neonate pigs were isolated and identified by cell proliferation, cell surface markers or the gene expression of stem cells (CD44, CD90, CD105 or *Oct4* and *Nanog*, respectively). Cells were differentiated into adipose or muscle cells and treated with the PPAR agonists; adipogenic and myogenic differentiation was promoted by adding these compounds. The expression of *PPARγ* (an adipose marker) and *MyoD1* and *MyHC* (muscle markers), metabolic changes and expression levels of metabolic enzymes involved in glycolysis, lipogenesis, lipolysis and the pentose phosphate pathway were tested by qPCR. **Results:** MSCs from neonate pigs exhibited high proliferation and were positive for CD44, CD90 and CD105 markers and *Oct4* and *Nanog* expression. The treatment that promoted the highest expression of *PPARγ* was 50 μM of conjugated linoleic acid (CLA) c9 t11 (6.44 ± 0.69-fold, $p < 0.0001$) in the adipose differentiation, and upregulation of *HX2*, *ACCAα*, *ATGL*, *LPL* and *G6DP* ($p < 0.0001$) and downregulation of *PFK* and *ACCAβ* ($p < 0.0001$) were found. For muscle differentiation, the best treatment was 50 μM of CLA c10 t12 (59.72 ± 4.72-fold, $p < 0.0001$), and metabolic changes were upregulation of *PFK*, *ACCAβ*, *G6DP*, *CPT1* and *PPARβ/δ* ($p < 0.0001$), but no effect was observed with *HX2* and *ACCAα* ($p < 0.05$). **Conclusions:** Our results suggest that differentiated cells exhibit a typical cell lineage metabolism and higher efficiencies both in anabolism and catabolism.
© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from various species, including humans [Boura et al., 2014], mouse [Casey et al., 2014], rat [Wang et al., 2014a], swine [Brückner et al., 2013], bovine [Dueñas et al., 2014],

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/cto

© 2016 S. Karger AG, Basel
1422–6405/16/0000–0000$39.50/0

Ofelia Mora Izaguirre
Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN)
Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM
Blvd. Juriquilla 3001, INB Lab. A03, Querétaro City, Querétaro 76230 (Mexico)
E-Mail ofemora66@unam.mx

Abbreviations used in this paper

CLA	conjugated linoleic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
FBS	fetal bovine serum
HS	horse serum
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
LPL	lipoprotein lipase
MP1	myogenic protocol 1
MP2	myogenic protocol 2
MP3	myogenic protocol 3
MRFs	myogenic regulatory factors
MSCs	mesenchymal stem cells
Myf5	myogenic factor 5
MyHC	myosin heavy chain
MyoD1	myogenic differentiation 1
PBM	porcine bone marrow
PBS	phosphate balance solution 1x
PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
PPP	pentose phosphate pathway
RPL13a	ribosomal protein L13a
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein

ovine [Adamzyk et al., 2013], and chicken [Khatri et al., 2009]. MSCs from these species have been used as research models for tissue engineering and repair, disease treatment, and handling of cell differentiation for the development of biotechnology tools. They are characterized by a high rate of renewal, proliferative ability and multipotentiality. The latter term refers to their ability to differentiate into various cell lineages, such as chondrocytes [Mathieu et al., 2014], osteocytes [Cho et al., 2014], adipocytes [Casado et al., 2012], neurons [Nandy et al., 2014], and myocytes [Meligy et al., 2012].

During the cell differentiation process, changes in gene expression and chromatin remodeling occur [Ruijtenberg and van den Heuvel, 2016]. These modifications modulate the time to maturity of adipocytes and myocytes [Gang et al., 2004; Musri et al., 2007; Okuno et al., 2013; Rozwadowska et al., 2013]. Positive markers such as FABP or *PPARγ* for adipogenesis [Cho et al., 2014] and paired box protein Pax-7, myogenic factor 5 *(Myf5)*, myogenic differentiation 1 *(MyoD1)*, or myosin heavy chain *(MyHC)* for myogenesis [Costa et al., 2010] are often used.

The PPARs, a subfamily of nuclear receptors [Bois and Grosveld, 2003] that modulate glucose homeostasis *(PPARα, PPARγ)* as well as fatty acid oxidation, transport, and synthesis *(PPARα, PPARβ/δ* and *PPARγ)* [Germain et al., 2006], are ligand-dependent transcription factors [Bois and Grosveld, 2003] that play a key role in energy homeostasis. *PPARβ/δ* increases the proliferation and differentiation of myoblasts through *FoxO1*, and its expression is associated with the processes of myogenesis and myocyte fusion [Rogue et al., 2010; Angione et al., 2011]. *PPARγ* is considered the key gene in adipogenesis because it controls the expression of genes in adipocytes, such as fatty acid binding protein 4, adipocyte *(FABP4)* and lipoprotein lipase *(LPL)* [Wang et al., 2011].

PPAR agonists, such as rosiglitazone [He et al., 2010], telmisartan [Zhai et al., 2010], conjugated linoleic acid (CLA) [Djouadi et al., 2003], bezafibrate [Son et al., 2001], and L165 [Gao et al., 2014], have been used to increase fat and muscle differentiation; however, there is limited information on the metabolic changes in mature cells.

In the present work, MSC from porcine bone marrow (PBM)-MSCs were used as a model, and methods to preserve their characteristics and to effectively induce their differentiation into the adipose and muscle lineages are described. Additionally, the effects in the expression of *PPARγ* with four agonists on adipogenesis [rosiglitazone, telmisartan, CLA (c9 t11 and c10 t12)] and the effects on the expression of *MyoD1* and *MyHC* with four tested reagents on myogenesis (telmisartan, bezafibrate, CLA c10 t12, and L165) are reported. Finally, changes in the expression of key metabolic enzymes of several metabolic pathways (glycolysis, lipogenesis, lipolysis, and the pentose phosphate pathway, PPP) were determined.

Materials and Methods

Animals

All procedures involving animals were approved by the Internal Committee for the Use and Care of Experimental Animals (CICUAE-UNAM).

Isolation and Cell Culture

Femur and tibia aspirates from 4 0- to 2-day-old pigs with three replicates each were used to extract PBM-MSCs using isolation medium, which consisted of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 4,500 mg/l of D-glucose and 110 mg/l of sodium pyruvate (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA), and antibiotics (100 U/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin and 25 μg/ml amphotericin; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Approximately 18 ml of bone marrow aspirates were collected. Cells were isolated by centrifugation at 450 *g* for 5 min at room temperature. The pellets obtained were washed three times with isolation medium and resuspended in basal medium (DMEM, 10% fetal bovine serum, FBS; Invitrogen) and antibiotics. Cells were maintained at 37°C with 5% CO_2 and 95% humidity.

Characterization of PBM-MSCs

To identify the cultured population, we used the five characteristics that differentiate MSCs from other cell types as a reference. These characteristics are adherence to plastic, proliferation capacity, stem cell markers and stem cell-associated antigen expression, and also the capability to differentiate into mature cells of two types (meaning multipotentiality).

Proliferative Potential of PBM-MSCs

The cell growth curve, number of cell doublings, and doubling time were calculated using formulas previously described [Pisani et al., 2010; Xiao et al., 2010]. Cells (10^4) were seeded in 3.5-cm culture dishes (Corning Inc., Corning, N.Y., USA) with three replicates per animal. Stationary subcultures were harvested every 4 days until the 15th passage. Adhered cells were washed twice with phosphate balance solution 1x (PBS), separated with trypsin (TrypLE Express; Invitrogen), incubated for 5 min at room temperature, and counted with a hemocytometer.

Genotype Analysis

Cells seeded at a density of 1×10^4 in 3.5-cm culture dishes were used to determine the genotype. The expression of mRNA for the MSC marker genes in passages 2, 4, 6, 8, 10, and 12 was determined by PCR (polymerase chain reaction). These genes were *Oct4* (POU class 5 homeobox 1), *Nanog* (nanog homeobox), *Sox2*, ABCG2 (ATP-binding cassette subfamily G member 2), CD90 (thy-1 cell surface antigen), CD105 (endoglin), CD44 (hyaluronate receptor), and CD34 (hematopoietic progenitor cell antigen). The primer sequences are listed in table 1.

Phenotype Analysis

The specific markers CD44 (rat monoclonal-FITC, IM7; Abcam, Cambridge, Mass., USA) and CD90 (mouse monoclonal, MRC OX-7, Abcam) were used to characterize the cell-surface antigen profile of the PBM-MSCs and CD34 (rabbit monoclonal, EP373Y, Abcam) to characterize hematopoietic cells. Cells were grown on coverslips coated with 50 µg/ml of poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) and fixed with 3.5% formaldehyde in PBS for 1 h, washed three times with PBS, permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS, washed again and blocked with 1% FBS in PBS for 1 h at room temperature to avoid unspecific binding of the antibodies. Cells were then incubated overnight at 4°C with the antibodies against CD44 (1:1,000), CD90 (1:500), and CD34 (1:1,000). The cells were then washed five times with PBS, blocked again under the same conditions, incubated with the secondary antibody conjugated to CY3 (1:1,000, CY3-α-mouse or CY3-α-rabbit; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pa., USA) in PBS with 1% FBS for 1 h at room temperature in the dark and washed three times with PBS. A 40-min incubation with TO-PRO®-3 stain (1:5,000; Life Technologies) was used for the counterstaining. Finally, the coverslip was mounted with a drop of Dabco (Sigma-Aldrich) and glycerol (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J., USA), then sealed and stored at –20 or 4°C, protected from light.

Microscopy

All images were captured using a Confocal Microscope LSM 510 (Carl Zeiss Inc. Jena, Germany) and analyzed using ZEN lite software from Zeiss.

Differentiation Assays

For the two differentiation processes (adipogenesis and myogenesis), the best induction medium and suitable time in culture were determined in passages (stationary subcultures every 4 days) 2, 3, 4, and 8 for the adipogenic induction and passages 2, 4, 6, 8, and 10 for the myogenic induction. The cell density was 1×10^4 cells in 3.5-cm culture dishes with duplicates for each animal.

Adipogenic Potential of PBM-MSCs

Before induction, cells were maintained for 5 days in basal medium until they reached 60% preconfluence. We used adipogenic protocol 1, which includes two phases of differentiation – the adipose differentiation phase 1 medium containing DMEM, 0.5% 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 100 nM of dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10 g/ml of insulin (Invitrogen) and antibiotics – in which the cells were incubated for 24 h. Thereafter, the cells were maintained for 35 days in adipose differentiation phase 2 medium containing DMEM, 5% FBS, 10 g/ml of insulin, and antibiotics. *PPARγ2* was used as a positive marker of adipogenesis (see table 1 for the primer sequences) and they were measured by qPCR.

Myogenic Potential of PBM-MSCs

Cells were cultured in basal medium until they reached 60% preconfluence. Three different muscle differentiation protocols were tested. Myogenic protocol 1 (MP1) was as described previously [Pisani et al., 2010] with some modifications. Briefly, F10 medium (Invitrogen) with 20% FBS, 10 mM of HEPES (J. T. Baker), 2 mM of glutamine (Invitrogen), 10 µM of dexamethasone, 2.5 ng/ml of fibroblast growth factor (Sigma-Aldrich) and antibiotics was used until the cells reached 80% preconfluence, at which point it was changed to a muscle differentiation medium composed of DMEM, 2% horse serum (HS; Invitrogen), 2 mM of glutamine, 10 mM of HEPES, 10 µM of dexamethasone, 2.5 ng/ml of fibroblast growth factor, 10 µg/ml of insulin, 5 µg/ml of transferrin (Sigma Aldrich) and antibiotics for 35 days. Myogenic protocol 2 (MP2) consisted of a container containing DMEM myogenic medium, 10 µM of 5-azacytidine (Sigma-Aldrich), 10% FBS, 5% HS, and antibiotics, with an incubation period of 24 h. Then they were kept for 21 days in the same medium but without 5-azacytidine. Myogenic protocol 3 (MP3) used the myogenic medium described previously by Gang et al. [2004] with some modifications. Briefly, cells were maintained for 30 days in DMEM with 0.1 µM of dexamethasone, 50 µM of hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 5% HS, and antibiotics. The genes *MyoD1*, *Myogenin* and *MyHC* (for the primer sequences see table 1) were used as positive markers for muscle differentiation and were measured by qPCR.

Effects of PPAR Agonists on Adipogenesis and Myogenesis

After determining the best induction medium for adipogenesis and myogenesis, the effects of PPAR agonists on differentiation and metabolic changes were determined. The gene expression of several metabolic enzymes, such as *HX2* (hexokinase 2), *PFK* (phosphofructokinase), *ACCAα* (acetyl CoA carboxylase-α), *ACCAβ* (acetyl CoA carboxylase-β), *FABP4*, *ATGL* (triglyceride lipase), *LPL*, *G6PD* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), and *PPAR-β/δ* (all primer sequences are listed in table 1) were measured in the best differentiation treatments by qPCR.

For this experiment, PBM-MSCs of neonatal pigs were again isolated. Cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells/well, in

Table 1. Specific primers designed for target genes

Gene	Primer sequences (forward/reverse)	Reference sequence accession No.	Product size, bp	Annealing temperature, ° C
Oct4	F 5′GTGTTCAGCCAAACGACCAT R 5′CTGGGCGATGTGGCTGATCT	NM_001113060	264	60
Nanog	F 5′ACTGTCTCTCCTCTTCCTTC R 5′GCCTCTGAAATCTGTCGTTG	NM_001129971	202	58
Sox 2	F 5′AGCTACGCGCACATGAATGG R 5′CTCACGTCGTAGCGGTGCAT	NM_001153265	280	62
CD90	F 5′TGCCGATTGTGCGGGAAGCA R 5′AGGTCCGAGTTCTGGAAGCGCA	NM_001034765	198	60
CD44	F 5′CGGACCTGCCCAATGCCTTTGA R 5′TGCACAGTTGGGAGGTGCGT	NM_174013	226	62
CD45	F 5′AAGCTGCGCAGGAGGGTAAACG R 5′TGTGCCTCCACCTGCACCAT	BC148881	206	58
ABCG2	F 5′AGCAGCCCTTCGGCTTCCAA R 5′AGCCAGTTGTGGGCTCATCCA	BT030709	218	60
CD34	F 5′GCCACCTCCAGAAACGGCCA R 5′GTGGGTGTGTGCGCTGGGAA	NM_174009	189	58
CD105	F 5′CCATCAAAAGCCTGACCTTCGG R 5′AGTCTGATGACCACCTCGTT	NM_214031.1	142	60
YWHAZ	F 5′TTCTACTAAGAGCACCGAGA R 5′GCTGCTGATCACCAACAACC	NM_214379	225	60
EFIa	F 5′TCCGCGACGTAGATTTG R 5′AGACCTTGAAGAAGCGACCT	NM_001002824	177	62
RPL13a	F 5′AGACTGGAGACAAGGTGGGA R 5′ACACCCTCCAGAAAGCGAGA	NM_001270491.1	289	60
PPIA	F 5′AGCTACGCGCACATGAATGG R 5′CTCACGTCGTAGCGGTGCAT	NM_021130	179	58
18S	F 5′AACCAGACAAATCGCTCCACC R 5′CGGCGTTATTCCCATGACCC	NM_29087	266	63
MnSOD	F 5′GACCCATTGCAAGGAACAA R 5′GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC3	X04972	69	60
PPARγ	F 5′GTTCGAGTTTGCTGTGAAGT R 5′AGGTCTGTCATTTTCTGGAG	NM_214379	225	60
Myogenin	F 5′GGGCGTGTAAGGTGTGTAAG R 5′GCGCTCTATGTACTGGATGG	FJ979804.1	267	64
MyoD1	F 5′TGACTCAGACGCATCCAGCCC R 5′CGACACCGCAGCATTCTTCCC	NM_001002824	157	63
MyHC	F 5′TCCGCGACGTAGATTTG R 5′ACGGGAAGTGCGAGTGTT	NM_001002824	177	63

duplicates for each animal. They were main-
ium for 5 days or until an 80% preconfluence
ıe treatments were applied. For both differen-
ere set, the final control, which was untreated,
, to which the highest volume of vehicle was

nipulation with PPAR Agonists

ocol 1 was used for adipose induction supple-
ınd 30 μM of rosiglitazone, 12.5, 25, and 50 μM
0 t12, and 5, 10, and 20 μM of telmisartan (all
ı).

Myogenesis Manipulation with PPAR Agonists

MP3 was used for muscular induction. Four compounds were tested: telmisartan (12.5, 25, and 50 μM), bezafibrate (100, 200, and 400 μM), CLA c10 t12 (12.5, 25, and 50 μM), and L165 (10, 20, and 40 μM; Sigma-Aldrich). To corroborate muscle differentiation in the most myogenic treatment, PCR was performed with oligonucleotides for myogenic factors and markers (*MyoD1*, *Myogenin* and *MyHC*; see the table 1 for the primer sequences).

RNA Isolation and RT-qPCR

RNA was extracted with Trizol according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Samples were eluted in 30 μl of

RNase-free water and quantified in the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Del., USA) at 260 nm. Samples had 260–280 ratios in the range 1.8–2.1, and their integrity was determined by 1% agarose gel electrophoresis. The RNA concentrations were registered and the samples were stored at –70°C. In order to eliminate genomic DNA contamination, the samples were treated with DNase I (Roche, Indianapolis, Ind., USA) for 15 min at room temperature and 5 min at 70°C. To obtain the cDNA, reverse transcription using SuperScript II (Invitrogen, Life Technologies) and oligo dT15 was carried out following the manufacturer's protocol.

The reagents for qPCR were 1 mM of MgCl, 1 µl of Sybr Green (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), and 0.25 µM of each gene-specific primer in a final reaction volume of 10 µl, and was performed using the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). The program consisted of a preincubation at 95°C for 10 min, 40 cycles of three steps: denaturation at 95°C for 1 min, alignment to the specified temperature (table 1) for 10 s, and amplification at 72°C for 15 s, followed by a melting curve beginning at 50°C with a ramp of 0.35°C to check the purity of the amplicons.

The qPCR experiments were performed following the MIQE Guidelines [Bustin et al., 2009]. The $2^{-\Delta\Delta ct}$ method was used to determine gene expression [Livak and Schmittgen, 2001]. We used the diluent control for calibration normalized to the geometric mean [Vandesompele et al., 2002] of the best pair of housekeeping genes. Gene expression was calculated to the control and expressed as the fold induction. The following six were tested to select the best housekeeping genes: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein *(YWHAZ)*, ribosomal protein L13a *(RPL13a)*, elongation factor 1 alpha, peptidylprolyl isomerase A *(PPIA)*, *18S*, and manganese superoxide dismutase (refer to table 1 for the primer sequences). Housekeeping gene stability was determined by the programs NormFinder (MDL, Aarhus, Denmark) [Andersen et al., 2004] using the data obtained from a random sample with two replicates per treatment per animal. In the case of adipogenesis, passages 2, 8, and 10 were tested, and passages 2, 6, and 10 were tested for myogenesis. The selected housekeeping genes were *YWHAZ* and *RPL13a* for adipogenesis and *PPIA* and *RPL13a* for myogenesis. The gene-specific primers were designed using the Oligo 7 program based on mRNA sequences published in the NCBI. The correct size of the amplified qPCR products was confirmed in an agarose gel electrophoresis, the identity of the qPCR products was confirmed by sequencing in the 310 ABI Prism sequencer with a version 3 Big Dye (Applied Biosystems) and compared to the target genes using BLAST search (National Center for Biotechnology Information; Bethesda, Md., USA).

Statistical Analysis

To study the growth curves, data were subjected to a stepwise regression analysis using the general liner model from SAS statistical software [SAS Institute, 2008], which determines whether the data best fit a linear, quadratic or cubic model. For changes in gene expression, data were analyzed with a completely randomized model. A one-way ANOVA was obtained for each analysis using the SAS statistical software general linear model procedure. Least square means ± SEM were used to analyze the differences among treatments. p values ≤0.05 were considered to be statistically significant.

Table 2. Gene expression of MSC markers in PBM-MSCs determined by PCR

Gene	PBM-MSCs	Decrease in the expression (days of culture)
Oct4	+	20
NANOG	+	15
Sox2	–	0
CD90	+	48
CD105	+	35
CD44	+	48
CD34	–	0
CD45	–	0

Results

Isolation and Cell Culture

The method of cell isolation and extraction was effective in obtaining bone marrow cells from neonate pigs. The culture conditions allowed the maintenance of viable cells for 95 days.

Characterization of the PBM-MSCs

The cell population met the five criteria associated with MSCs mentioned in Materials and Methods.

Proliferative Capacity of PBM-MSCs

Adherence to plastic was tested by washing during the first days of culture, thus eliminating nonadherent cells. The proliferative capacity of the PBM-MSCs was characterized by three cell behavior curves. The cell growth curve indicated a total of $28.2 \times 10^6 \pm 0.46$ cells (fig. 1a). In the case of population doublings, a total of 34.72 ± 1.46 was obtained (fig. 1b). For the population doubling time curve, the data indicate that the shortest time point was after 21 days of culture with 1.56 ± 0.31 days (fig. 1c).

Genotype Analysis

Our data demonstrate that cultured cells expressed MSC marker genes (table 2). The expression of *Oct4* continued for up to 15 days, while *Nanog* expression was maintained for only 5 days in culture. CD105, CD44, and ABGC2 were expressed for the first 35 days, while CD90 was expressed for 48 days in culture, and CD34 was not expressed at all.

Phenotype Analysis

The cell surface antigen profile of the PBM-MSCs was characterized by immunocytochemical assay for the spe-

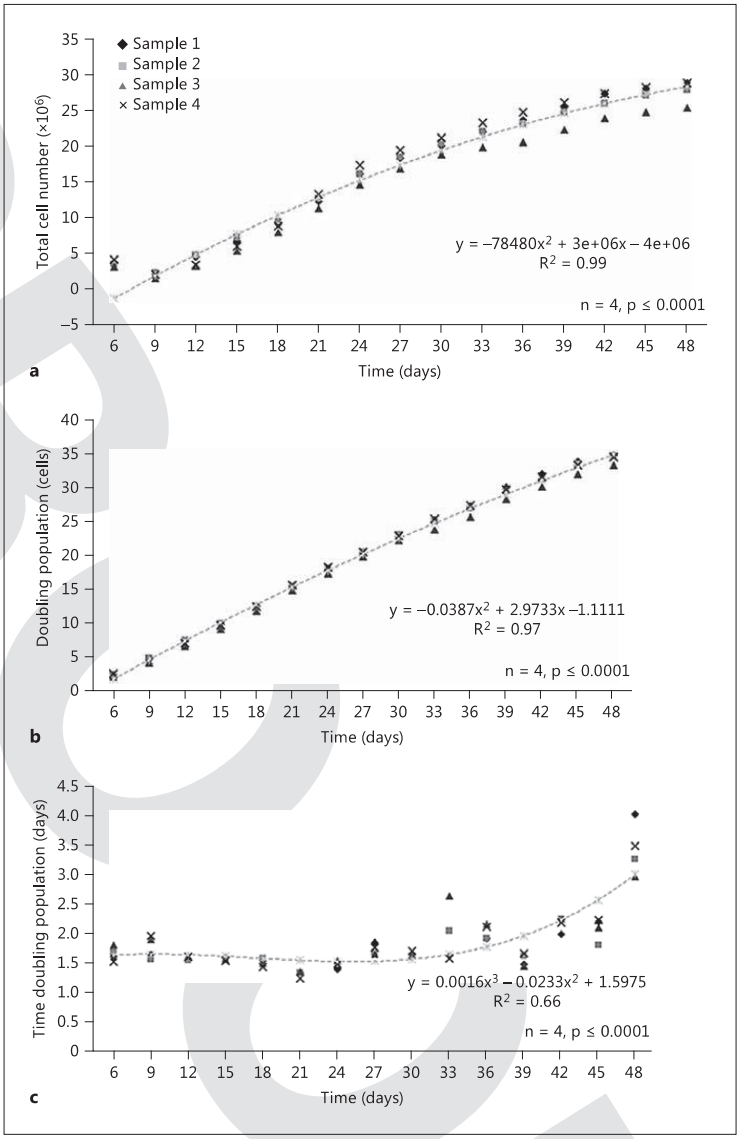


Fig. 1. Cell growth curves of PBM-MSCs from 4 neonatal pigs, plotted individually in three different ways: cumulative cell number versus time (**a**), cumulative cell doublings versus time (**b**), and doubling time versus time (**c**). The cells were cultured on basal medium for 48 days with passages every 3 days. The curves represent cell behavior throughout the culture and depict the proliferation potential. **a** A total of $28.2 \times 10^6 \pm 0.46$ cells was reached. **b** There was a total of 34.72 ± 1.46 cell population doublings. **c** The shortest time interval for population doubling was 1.35 ± 0.15 days, which occurred at 21 days in culture. The growth curve data were subjected to stepwise regression analysis using the SAS statistical package to determine whether they best fit a linear, quadratic or cubic model.

cific markers CD44, CD90, and CD34. Cells at passages 1, 4, and 10 were positive for CD44 and CD90 but negative for CD34 (fig. 2).

Differentiation Assays

The capacity to differentiate into mature cell lineages was proven by obtaining adipocyte and myocyte cultures expressing *PPARγ* (adipocytes) or *MyoD1*, *Myogenin* and *MyHC* (myocytes), respectively (fig. 3a).

Adipogenic Potential of PBM-MSCs

Differentiated cells showed cytoplasmic triglycerides by the 20th day of treatment and changed from a fibroblastoid to round morphology with nuclei in the periph-

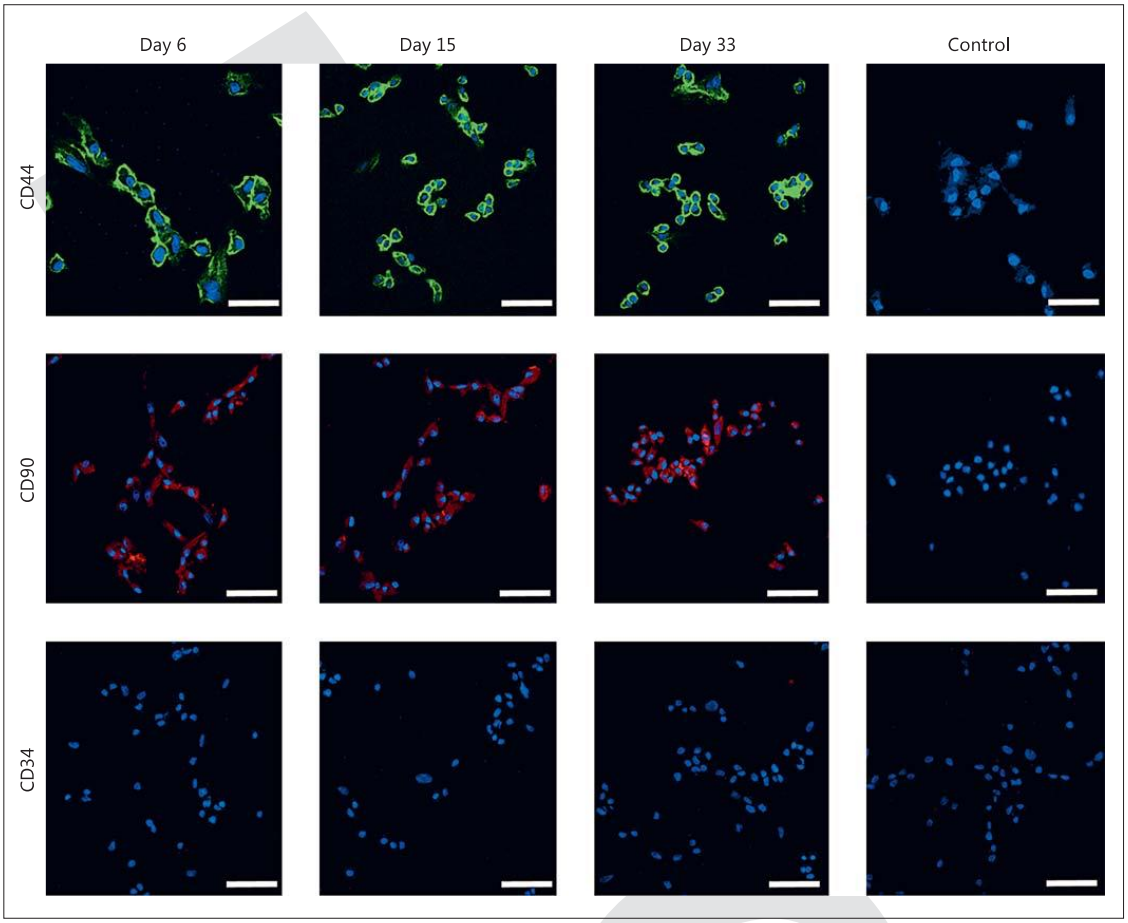
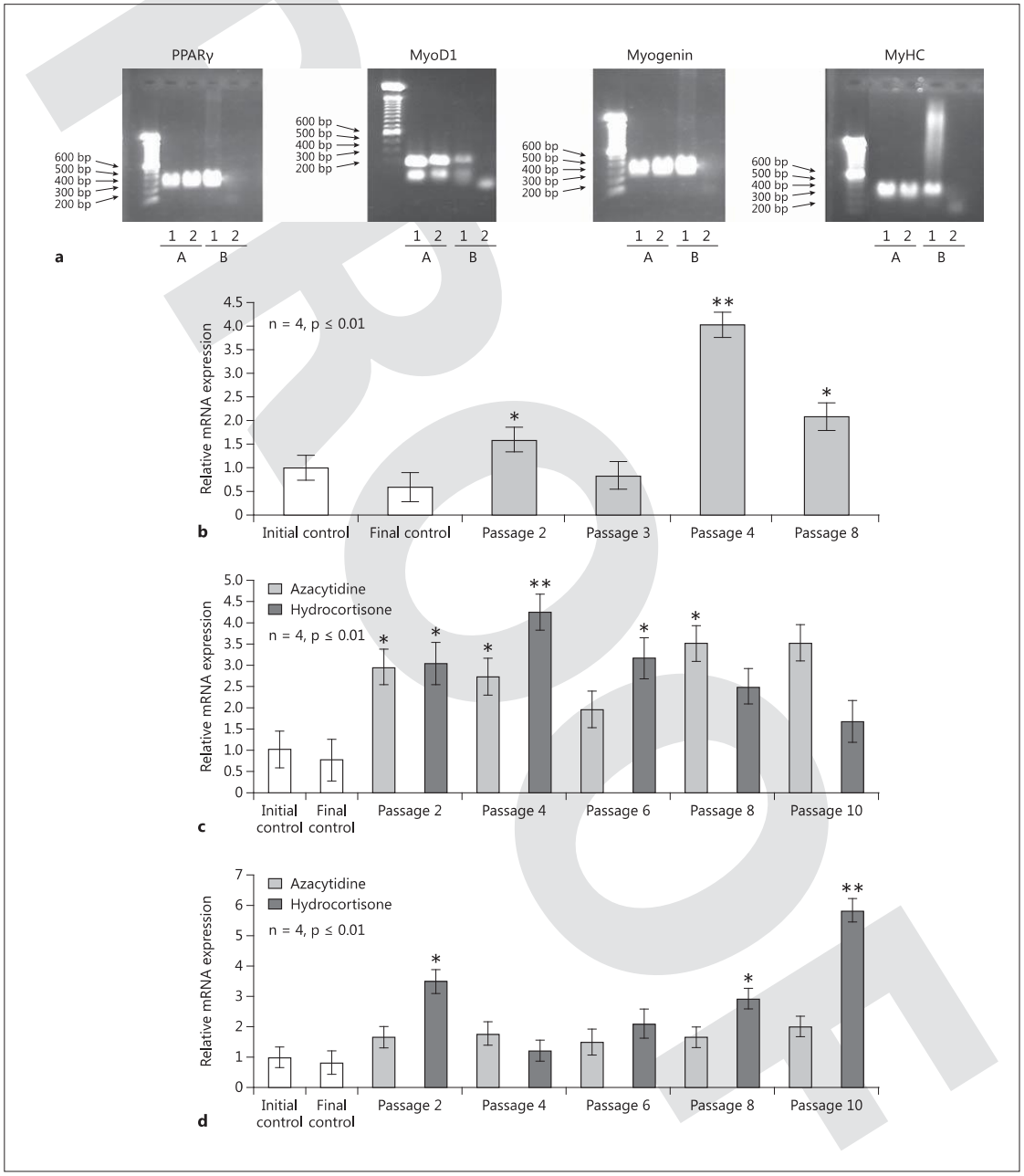


Fig. 2. Immunostaining of PBM-MSCs in cell culture at different passages and visualized under a fluorescence confocal microscope. The phenotype was determined on days 6, 15 and 33 of culture (passages 1, 4, and 10, respectively). The phenotype was preserved for 33 days of culture for CD44 and CD90 in passages 1, 4, and 10, but they did not present immunoreactivity for CD34 at any passage tested. Scale bars = 50 μm.

ery (fig. 4a). With the protocol used for adipose induction, we obtained cell cultures that were positive for *PPARγ* in all of the passages tested (2, 3, 4, and 8; fig. 3b). The NormFinder algorithm was used to determine the best housekeeping genes. *YWHAZ* and *RPL13a* were the most stable genes with a stability value of 0.006 for the best combination of the two genes. The efficiency curves for *PPARγ*, *YWHAZ*, and *RPL13a* were obtained (table 3, lines 1, 4, and 5). Furthermore, validation curves between *PPARγ* and the housekeeping genes were determined with the equations $y = -0.0008x + 4.1683$, $R^2 = 6e{-}05$ for *PPARγ/YWHAZ* and $y = -0.1108x + 4.3549$, $R^2 = 0.1087$ for *PPARγ/RPL13a*.

In the passages tested for adipose differentiation, the highest expression of *PPARγ* was obtained at passage 4 (fig. 3b) with a 4.02 ± 0.29-fold increase ($p \leq 0.0001$) when compared to all other passages and the initial control. Initial and final controls expressed basal levels of *PPARγ* in the four passages analyzed, which did not differ significantly ($p \geq 0.05$). *PPARγ* expression increased in



3

(For legend see next page.)

passages 2, 4, and 8 when compared to its own initial and final controls ($p \leq 0.0001$). Thus, passage 4 was determined to be optimal for the adipose induction.

Myogenic Potential of PBM-MSCs

Cells induced using MP1 presented no morphological changes (fig. 4b). The cells treated with MP2 changed from a fibroblastoid morphology to an elongated cell with membrane fusion and multiple nuclei (fig. 4c). MP3 demonstrated a more noticeable change over the 25 days of treatment, with some fused cells that grew unidirectionally (fig. 4d). The housekeeping gene analysis with the NormFinder algorithm indicated that *RPL13a* and *YWHAZ* were the most stable pair with a stability value of 0.007. Subsequently, the efficiency curves for *MyoD1*, *MyHC*, *YWHAZ*, and *RPL13a* were obtained (table 3, lines 2 and 3). Validation curves were determined for *MyoD1* and *MyHC* with respect to the housekeeping genes. The following equations were obtained: for *MyodD1/YWHAZ*, $y = -0.1624x + 4.3267$, $R^2 = 0.0422$; for *MyoD1/RPL13a*, $y = -0.1156x + 3.9971$, $R^2 = 0.1578$; for *MyHC/YWHAZ*, $y = -0.0211x + 4.575$, $R^2 = 0.0075$, and for *MyHC/RPL13a*, $y = -0.031x + 4.8243$, $R^2 = 0.0073$.

Expression levels of mRNA for *MyoD1* and *MyHC* in the treated cells were determined for MP2 and MP3 (5-azacytidine and hydrocortisone, respectively). MP1 cells did not express any of the markers and were therefore discarded. The initial and final controls had low basal expression of *MyoD1* mRNA and did not differ significantly ($p \geq 0.01$). However, when comparing the two controls with the two treatments, its expression in all passages was different ($p \leq 0.0001$) with the exception of passage 10 with hydrocortisone ($p \geq 0.01$). When analyzing the protocols individually, the potential for muscle induction of treatment with 5-azacytidine was equal at passages 2, 4, 6, 8, and 10 ($p \geq 0.05$), while for the protocol with hydrocortisone, the differentiation increased from passage 2 (3.02 ± 0.48, $p \geq 0.05$) to 4 (4.22 ± 0.42, $p \leq 0.0001$) but progressively decreased along the passages, obtaining an expression equal to the controls (1.67 ± 0.48, $p \geq 0.05$) for the 10th passage (fig. 3c).

The results of the expression levels of *MyHC* showed that treatment with MP3 (hydrocortisone) was more ef-

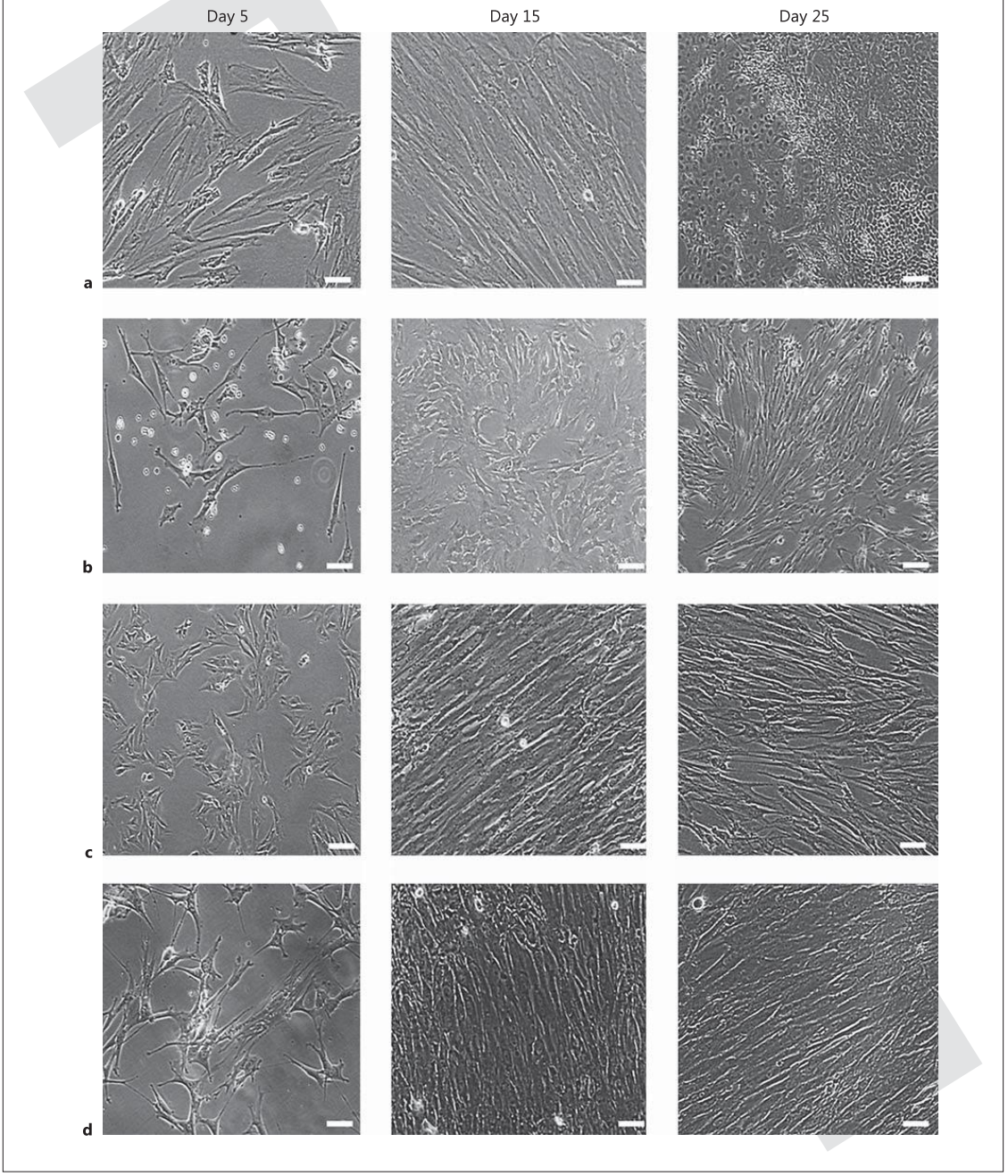
Table 4. Recognition sites for PPAR and glucocorticoid transcription factors on the MRFs

Gene	Species	Recognition
Myf5	*H. sapiens*	*GR, ERα, Myogenin, C/EBPα*
MyoD1	*B. taurus*	*C/EBPδ, GRα GRβ, PPARα/β*
Myogenin	*G. gallus*	
	O. aries	
	M. musculus	
	R. norvegicus	
	S. Scrofa	

Table 3. Analysis of qPCR efficiency

Gene	Efficiency of the PCR reaction, %	Value of R^2	Slope
PPARγ	96	99	–3.3
MyoD1	98	98	–3.2
MyHC	98	97	–3.1
YWHAZ	96.8	99	–3.25
RPL13a	97	98	–3.27

Fig. 3. a Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR products from RT-PCR reactions for expression of positive markers of adipose and muscle differentiation in PBM-MSCs. *PPARγ:* A – PBM-MSCs differentiated to adipose lineage; passage 4 (1); passage 8 (2); B – control samples; swine adipose tissue (1); basal medium (2). *MyoD1, Myogenin, MyHC:* A – PBM-MSCs differentiated to muscle lineage; protocol 2 (1); protocol 3 (2); B – control samples; swine muscle tissue (1); basal medium (2). Molecular weight marker = 100 bp. **b–d** Changes in gene expression during adipogenesis and myogenesis from MSCs. The initial and final control cells were maintained in basal medium throughout the entire period. The initial control mRNA was extracted at treatment initiation. The final control mRNA was extracted at the end of treatment. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. **b** Expression of *PPARγ* in cells treated with adipogenic induction medium. Cells of the 4th passage showed the highest expression of *PPARγ*. **c** Expression of *MyoD1* in cells treated with muscle induction medium. The treatment with 5-azacytidine caused a uniform level of *MyoD1* mRNA expression in all five passages tested. The treatment with hydrocortisone was most effective at promoting *MyoD1* mRNA expression in passage 4 and decreased continually in the following passages. **d** Expression of *MyHC* in the cells treated with muscle induction medium. The treatment with hydrocortisone further promoted the expression level in passage 10. A one-way ANOVA was performed for each analysis using the SAS statistical software general linear model procedure. The significance level was set at $p \leq 0.05$. Least square means ± SEM were used to analyze the differences within each data set.



4

(For legend see next page.)

fective than MP2 (fig. 3d). *MyHC* mRNA expression was highest at passage 10 (5.89 ± 0.38, $p \leq 0.0001$). In the case of passages 2 and 6, expression was similar to treatment with 5-azacytidine ($p \geq 0.05$) but different from the two controls ($p \leq 0.0001$). For passage 4, the two treatments were similar to both controls ($p \geq 0.05$).

To gain insight into the mechanism by which hydrocortisone favored MSC differentiation into mature myocytes, we analyzed the promoters of genes involved in the myogenesis process, namely *Myf5*, *MyoD1*, and *Myogenin*. To do this, sequences of 6 species were obtained *(Homo sapiens, Bos taurus, Gallus gallus, Ovis aries, Mus musculus, Rattus norvegicus, and Sus scrofa)* from the Genome Browser Gateway of the University of California-Santa Cruz, and the recognition sites for transcription factors in DNA were identified on TESS (Transcription Element Search System from Computational Biology and Informatics Laboratory at the University of Pennsylvania), a program based on finding reported consensus sequences for transcription factors. The results indicated that there are response elements for the PPAR nuclear receptor families and glucocorticoid receptors in the three genes analyzed (table 4).

Effect of PPAR Agonists on Adipogenesis and Myogenesis

PBM-MSCs were isolated from 0- to 2-day-old pigs. The cultures were maintained up to the passage selected for each cell differentiation, namely the 4th and the 10th for adipogenesis and myogenesis, respectively. To test the PPAR agonists, MP3 (hydrocortisone) was selected for muscle induction.

Adipogenesis Manipulation with PPAR Agonists

The morphological changes observed were subtle for almost all treatments. Rosiglitazone (10 and 30 μM), CLA c9 t11 (12.5, 25, and 50 μM), and telmisartan (25 μM) promoted a change from fibroblastoid to rounded cells with the presence of fat deposits in the cytoplasm. Treatment with CLA c10 t12 did not cause any change in cell morphology (fig. 5a, b).

DMSO was used as the calibrator for the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. Rosiglitazone (although only the 10-μM dose) promoted an increase in the expression of *PPARγ* mRNA (1.36 ± 0.11, $p \leq 0.0001$), while the remaining doses were similar to the diluent (fig. 6a). The highest level of *PPARγ* expression was obtained with 50 μM of CLA c9 t11 treatment (6.44 ± 0.69, $p \leq 0.0001$). In contrast to CLA c9 t11, the c10 t12 isomer had no significant effect. Finally, telmisartan promoted an increase in *PPARγ* mRNA expression only at the intermediate dose (10 μM; 3.39 ± 0.69, $p \leq 0.0001$; fig. 6b)

The expression of mRNA for the enzymes *HX2*, *PFK*, *ACCAα*, *ACCAβ*, *ATGL*, *LPL*, and G6DP was measured in cells differentiated to adipose tissue with 50 μM of CLA c9 t11. The data (fig. 6c) indicated increased expression ($p \leq 0.0001$) of mRNA for *HX2* (3.58 ± 0.24), *ACCAα* (2.61 ± 0.38), *ATGL* (3.16 ± 0.46), *LPL* (9.38 ± 1.69), and *G6DP* (4.94 ± 0.62), and downregulation of those for *PFK* (0.05 ± 0.005, $p \leq 0.0001$) and *ACCAβ* (0.009 ± 0.0008, $p \leq 0.0001$).

Myogenesis Manipulation with PPAR Agonists

There were no marked changes in morphology with most treatments, except for the 50 μM of CLA c10 t12 treatment, where cells were more elongated, with unidirectional disposition, and in fiber form (fig. 5c, d). The cultures expressed *MyoD1*, *Myogenin* and *MyHC* (fig. 7a).

The level of expression of *MyHC* mRNA was increased ($p \leq 0.0001$) with CLA c10 t12 in doses of 50 μM (59.72 ± 4.72) compared with the other treatments and the control. Bezafibrate (200 μM) also promoted greater expression (32.72 ± 4.72, $p \leq 0.0001$) and was different from the treatment with telmisartan at all doses and CLA in two doses (12.5 and 25 μM), but similar to L165 in two doses (10 and 20 μM). L165 (10 and 20 μM) was the third treatment that significantly increased the expression of mRNA for the differentiation marker *MyHC* (25.38 ± 4.09, $p \leq 0.0001$, and 25.59 ± 4.72, $p \leq 0.0001$, respectively; fig. 7b).

In the case of cells differentiated into muscle tissue, mRNA expression for *HX2*, *PFK*, *ACCAα*, *ACCAβ*, *G6PD*, *CPT1* (carnitine palmitoyltransferase I), and *PPARβ/δ* was measured. The treatment chosen was CLA c10 t12 as the most myogenic. The treatment promoted an increase ($p \leq 0.0001$) in the relative mRNA expression for PFK (4.03 ± 0.45), *ACCAβ* (6.42 ± 1.07), *G6DP* (3.09 ± 0.50), CPT1 (2.75 ± 0.19), and *PPARβ/δ* (2.84 ± 0.27, $p \leq 0.0001$), but had no effect ($p \geq 0.05$) on those for *HX2* (1.19 ± 0.12) and *ACCAα* (0.74 ± 0.08; fig. 7c).

Fig. 4. Morphological changes during adipogenesis and myogenesis; images were obtained with phase-contrast microscopy. Cultures were observed throughout the differentiation process. **a** The cultures induced to the adipose lineage showed morphological changes beginning with the 20th treatment. By the end of treatment, cells exhibited a rounded morphology and contained cytoplasmic triglycerides. **b** Cells induced using MP1 retained the fibroblastoid morphology. **c** Cells induced with MP2 showed subtle morphological changes. **d** MP3 induction presented elongated cells with cytoplasm fusion and multinucleated cells. Scale bars = 50 μm.

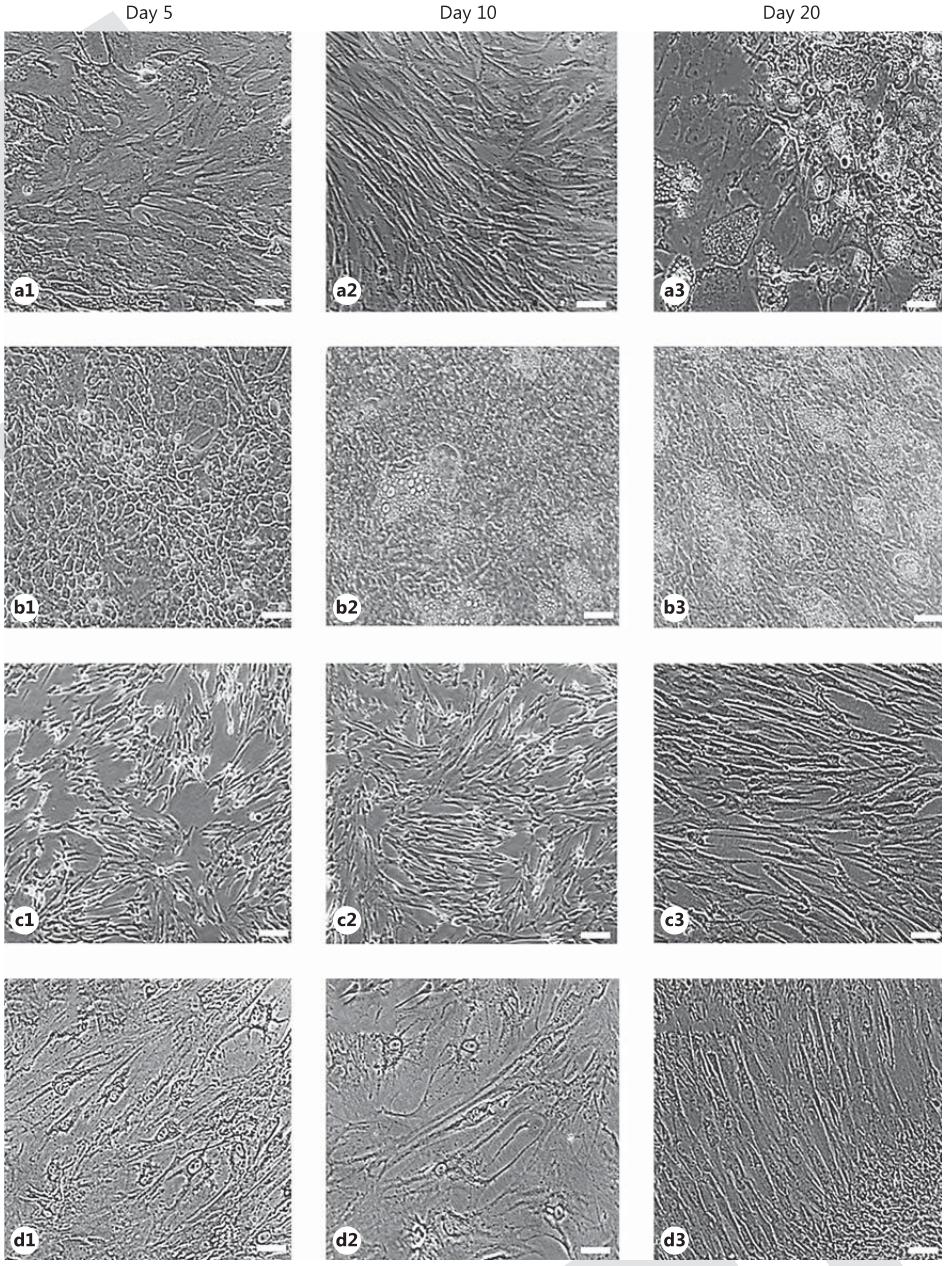


Fig. 5. Morphological changes during the application of adipose and muscle induction added with PPAR agonists (for adipogenesis, CLA isomer c9 t11 and CLA isomer c10 t12 for myogenesis). The images were obtained with phase-contrast microscopy. Cultures were observed throughout the differentiation process. **a1** Initial control, basal medium. **a2** Final control, basal medium. **a3** Positive control, adipose induction medium. **b** CLA c9 t11: 12.5 (**b1**), 25 (**b2**) and 50 μM (**b3**). **c1** Initial control, basal medium. **c2** Final control, basal medium. **c3** Positive control, muscle induction medium. **d** CLA c10 t12: 12.5 (**d1**), 25 (**d2**) and 50 μM (**d3**). Scale bars = 50 μm.

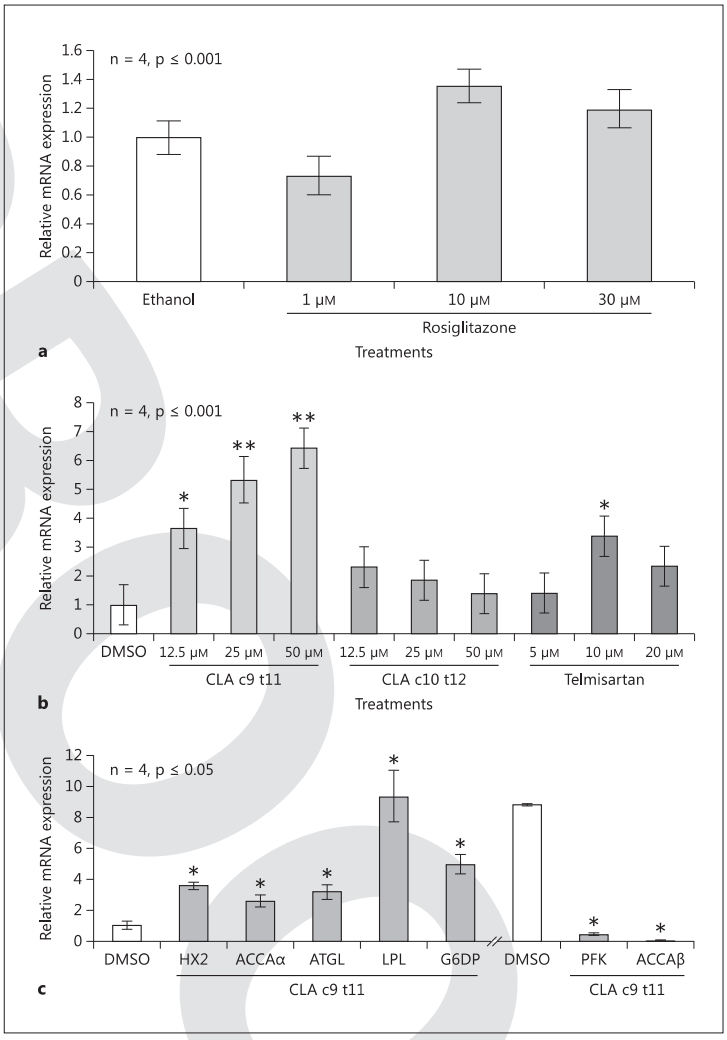


Fig. 6. **a** Changes in the expression of *PPARγ* by qPCR in the treatment with rosiglitazone compared with DMSO. The intermediate dose induced a greater expression of PPAR but was not different at the highest dose. **b** Changes in the expression of *PPARγ* by qPCR with the other treatments. The CLA c9 t11 proved to be the most adipogenic dose response. With CLA c10 t12 the effect was negative by inhibiting the adipogenesis dose response. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. **c** Changes in the expression of genes related to metabolism by qPCR. The genes *HX2*, *ACCAα*, *ATGL*, and *LPL* showed upregulation of *G6DP*. Conversely, *PFK* and *ACCAβ* had a negative regulation. A one-way ANOVA was performed for each analysis using the SAS statistical software general linear model procedure. The significance level was set at $p \leq 0.05$. Least square means ± SEM were used to analyze the differences within each data set. * $p \leq 0.05$.

Discussion

The cultured cell population showed the characteristics associated with MSCs [Zeng et al., 2006], including plastic adherence, proliferation capacity, cell marker and antigen expression associated with stem cells, and the ability to differentiate into mature cells of various types. The cell growth curves were obtained in order to corroborate the proliferative capacity, and our data are similar to those for cells isolated previously from the bone marrow of young and adult pigs [Comite et al., 2010; Tang et al., 2012]. We showed that PBM-MSCs conserve the ability to renew themselves for long periods in culture, reaching 48 days with 15 passages, which is similar to earlier reports [Colleoni et al., 2005].

In order to identify the expression profile of the cell populations studied, we focused on the pluripotency genes (*Oct4*, *Nanog* and *Sox2*). In the present investiga-

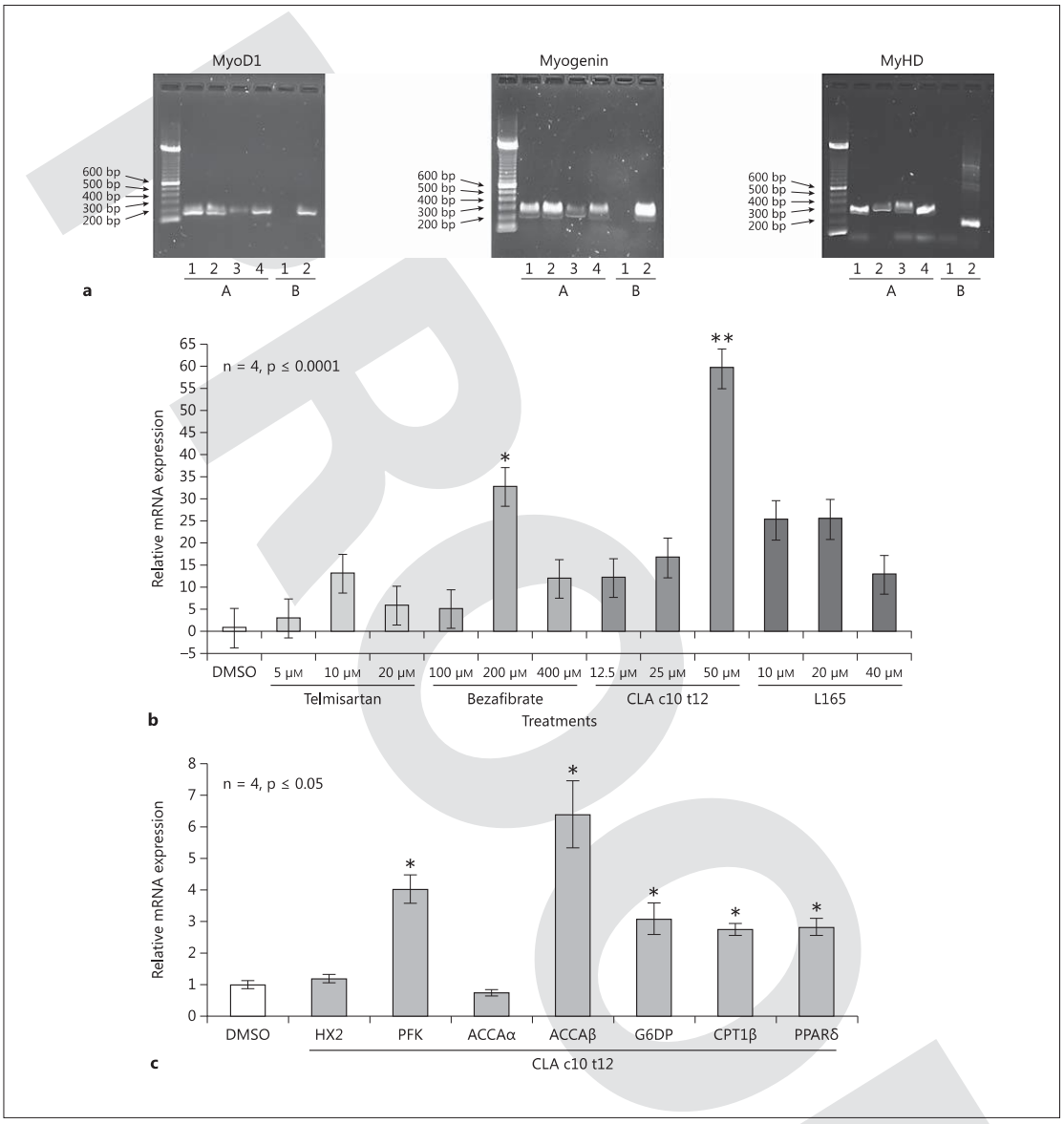


Fig. 7. a Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR products from RT-PCR reactions for the expression of positive markers of muscle differentiation in PBM-MSCs with CLA c10 c12. *MyoD1:* A – PBM-MSCs differentiated to muscle lineage; treated samples 3 (1–4); B – control samples; swine muscle tissue (1); basal medium (2). *Myogenin*, *MyHC:* A – PBM-MSCs differentiated to muscle lineage; protocol 2 (1); protocol 3 (2); B – control samples; swine muscle tissue (1); negative control of the reaction (2). Molecular weight marker = 100 bp. **b** Changes in MyHC gene expression during myogenesis with different PPAR agonists, analyzed by qPCR. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. **c** Change in gene expression in metabolic genes under treatment with CLA c10 c12, analyzed by qPCR. A one-way ANOVA was performed for each analysis using the SAS statistical software general linear model procedure. The significance level was set at $p \leq 0.05$. Least square means ± SEM were used to analyze the differences within each data set. * $p \leq 0.05$.

PROOF

tion the cells were positive for *Oct4* and *Nanog*, and it is important to note that these genes are not often associated with MSCs derived from bone marrow in humans and large animals. Actually, these genes are frequently reported as markers of embryonic stem cells or iPSCs; however, there are several articles that mention the positive expression of these markers in MSCs isolated from animal species. They are widely accepted to identify stem cell populations [Siegel et al., 2013; Silva et al., 2014; Lee et al., 2015; Ock et al., 2016]; in fact it has been reported that expression decreases with the age of the cell culture and degree of cell differentiation [Song et al., 2011; Yoon et al., 2011].

To characterize MSCs, two antibodies referred to as MSC markers, CD44 and CD90, were tested, as well as the hematopoietic cell marker CD34 as a control [Peterbauer-Scherb et al., 2010]. The antibodies used were previously reported to have cross-reactivity with pig [Poulsen et al., 2012], which is important because the antibodies widely used in other species, such as rats and mice, often do not give the same results in cattle, sheep, goats, and pigs.

We found that the expression of CD44 and CD90 was preserved until passage 10, which indicates that the population remained similar during the whole growth process. CD34 expression was not detected in any tested passage, suggesting that the cell cultures were free of contamination with hematopoietic-like cells.

The two processes of differentiation that interested us were adipogenesis and myogenesis. The protocol used for the former favored the differentiation of MSCs into adipocytes. In the present investigation, the agents used were IBMX, dexamethasone, and insulin; however, other protocols are available [Rosen et al., 2000]. Clonal expansion is promoted by IBMX and dexamethasone [Cao et al., 1991], leading to expression of the early differentiation genes *C/EBPδ* and *C/EBPβ* [Szczerbal et al., 2009], and insulin modulates adipocyte maturation and the expression of *PPARγ* [Csaki et al., 2007].

During adipogenesis, expression of GATA-binding protein 2, *C/EBPβ*, and *C/EBPδ* is recorded in earlier periods and, at the end of the process, *PPARγ*, *C/EBPα*, and *FABP4* are highly expressed [Ringe et al., 2002]. Therefore, the expression of *PPARγ* was used to verify that treated cells were differentiated to the adipose lineage and had become mature adipocytes. Other experiments have demonstrated the essential role of PPAR during adipogenesis by measuring the conversion of myocytes into adipocytes by the overexpression of this gene. The relative expression of *PPARγ* in passage 2 in this investigation was similar to previously reported results in an investigation using the same experimental model [Tomita et al., 2002].

Myogenesis is classified into three phases: determination, proliferation, and maturation. The first two phases are associated with the embryonic period [Wen et al., 2012], and most studies are focused on the precursors of maturation present in the muscle cells, known as satellite cells or myoblasts, which are documented as the expression of paired box protein *Pax-7*, a gene critical for conservation of the muscular quiescence state [Kumar et al., 2012]. However, in the case of the MSCs, introducing an undifferentiated state is necessary to meet all three phases of muscle differentiation.

MP2 and MP3 induced muscle differentiation from MSCs, as determined by the expression of *MyoD1* and *MyHC*. Prior to the selection of MP2, a review of the published literature showed a high diversity in the reagents used, and for this reason we decided to adapt a new medium (with 5-azacytidine) [Xu et al., 2004; Moscoso et al., 2005; Antonitsis et al., 2007; Zhang et al., 2009; Meligy et al., 2012]. During the first phase, epigenetic changes in the cell are the key to muscle differentiation with changes in chromatin remodeling that allow access to myogenic regulatory factors (MRFs) to start myogenesis [Lodish, 2004]. In most investigations, 5-azacytidine is applied as a demethylating agent, thus promoting free access to DNA and facilitating the expression of MRFs. In our present investigation, *MyoD1* was measured as a marker of muscle differentiation; this protein belongs to the MRFs and is considered an intermediate gene within myogenesis [Wen et al., 2012]; however, the expression of *MyHC* was low. From the data it can be assumed that 5-azacytidine commits the MSCs to the muscle lineage without completing the maturation phase, in contrast to hydrocortisone, which promotes cell maturation and was used in MP3 as the myogenic agent. To the best of our knowledge this is the first report in which hydrocortisone promotes MSCs isolated from neonatal pig bone marrow to differentiate into myocytes. The only previous reference using hydrocortisone was on human cells isolated from umbilical cord with a course of 6 weeks, reporting positive expression of *MyoD1* and *Myogenin* after 3 days of incubation and of *MyHC* after 3 weeks [Gang et al., 2004]. There are no reports which establish the mechanism of action by hydrocortisone enabling myogenesis; however, in this study, we analyzed the promoter regions of the *MRFs* – *Myf5*, *Myogenin*, and *MyoD1* – which indicated the presence of response elements for the three PPAR isoforms and for the glucocorticoids.

In our study, the treatment with CLA c9 t11 induced the highest expression of PPARγ mRNA. The results confirm a previous report [Tsuzuki and Ikeda, 2007] in which mouse MSCs were differentiated into adipocytes with the same agonist. CLA is considered a natural ligand of PPARγ, a nuclear receptor involved in many cellular functions that is altered in various disorders. Therefore, a variety of in vitro and in vivo experiments have reported CLA effects on the process of adipogenesis [Meadus et al., 2002; Benjamin et al., 2013, Kadegowda et al., 2013]. However, research on cells obtained from the bone marrow of neonate pigs is limited and studying the effects of CLA in this species is relevant because of its similarity to humans.

Most of the studies on adipogenesis in swine have been performed in vivo. For instance, the research by Brodie et al. [1999], who studied the pig fattening period by measuring levels of PPARγ mRNA expression in muscle and subcutaneous fat samples in animals fed with a CLA mixture, indicated that the addition of the agonist effectively promoted PPARγ expression and significantly increased the percentage of fat in the animals. However, there are also experiments that report a negative effect of CLA mixtures on adipogenesis, as measured by the expression levels of *PPARγ* and *C/EBPα* and the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Griswold et al., 2003]. It is noteworthy that the isomer composition of the CLA added in these and other experiments [Evans et al., 2000; Gillis et al., 2004] was not identified, which could account for the conflicting results.

It is known that the c9 t11 isomer of CLA promotes adipogenesis, and the purified c10 t12 isomer has the opposite effect, arresting adipogenesis and avoiding the triglyceride accumulation in preadipocytes [Evans et al., 2000]. Interestingly, our results confirmed these dual effects of CLA, which depend on the isomer used. When CLA c9 t11 was added, a dose-dependent increase in the expression of PPARγ was observed, but it remained unchanged when the c10 t12 isomer was used.

Rosiglitazone has been widely reported as a selective agonist of PPARs, and its adipogenic effects have been largely corroborated; however, two of the doses tested in the present study had no effect. We found significant adipogenic potential only with 10 μM of rosiglitazone, which is similar to the results of a previous report [Wang et al., 2011].

Cells treated with telmisartan registered lower expression levels of *PPARγ* than with the other agonists used. This effect may be the result of different available ways to modulate adipogenesis. Telmisartan treatment allows a modest fat accumulation as compared to thiazolidinediones treatment. Telmisartan selectively activates PPARγ, which recruits different coactivators that modulate the degree of accumulation of triglycerides during adipogenesis.

Treatment of MSCs with CLA c9 t11 increased the expression levels of *HX2*. This Mg^{2+}-dependent enzyme is involved in glycolysis and utilizes ATP to phosphorylate the glucose absorbed by the cell. Metabolic regulation of *HX2* occurs through its product, glucose-6-phosphate, and when it accumulates activity and expression of *HX2* decrease [Mathews et al., 2005]. *PFK* is regulated by the levels of ATP, citrate, and fatty acids [Mathews et al., 2005], and the CLAc9 t11 treatment had a negative effect on its expression.

The effects of the CLA treatment on the expression levels of the two *ACCA* isozymes of ACCA were opposite, increasing *ACCAα* and decreasing *ACCAβ*. *ACCAα* is involved in fatty acid biosynthesis; it catalyzes the formation of malonyl-CoA using one molecule of ATP and biotin as a cofactor [Travers et al., 2001]. This enzyme is positively regulated by a high concentration of citrate and bicarbonate, it is expressed mainly in the liver and adipose tissue, and is localized in the cytoplasm [Travers et al., 2001]. *ACCAβ* is involved in the oxidation of fatty acids by modulating the rate of β-oxidation, it is expressed to a greater extent in muscle, and it is located in the mitochondria [Abu-Elheiga et al., 2012].

The expression of *LPL* and *ATGL* were increased by the CLA c9 t11 treatment. It has been reported that the levels of expression of these genes are increased in 3T3-L1 cells during adipogenesis, as well as being proportional to the rate of change of triglycerides [Kershaw et al., 2006]. Experiments performed both in vivo [Haemmerle et al., 2006] and in vitro [Kershaw et al., 2006] have shown that *ATGL* expression is under *PPARγ* control [Kim et al., 2006]. The lipolytic capacity in adipocytes is related to the level of *ATGL* expression [Chakrabarti and Kandror, 2009]. It was demonstrated that low *ATGL* expression in adipocytes causes an imbalance between the accumulation and release of triglycerides, resulting in an atrophied and dysfunctional cell [Morak et al., 2012].

The expression of *G6PD* increased with CLAc9 t11 treatment. *G6PD* is the first enzyme of the PPP and it catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate to 6-phosphogluconolactone [Zhao et al., 2014]. This enzyme is a key modulator of the metabolic rate in the PPP, a route that provides the organism with NADPH, which is involved in several biological processes, but mainly as a reducing equivalent donor for fatty acid synthesis and ri-

bose-5-phosphate for nucleotide synthesis [Wang et al., 2014b]. *G6PD* activity has a fundamental role in counteracting oxidative stress by maintaining a reduced environment for the proper functioning of the cell.

From the above information and the results of this research, we can say that cells differentiated into the adipose lineage have a high glycolytic rate, favoring the accumulation of ATP, which serves as a metabolic signal for modulating fatty acid synthesis and increases lipogenesis. However, cells can modulate the amount of stored triglycerides by inhibiting the expression of *PFK*, changing the direction of the glucose-6-phosphate pathways to generate NADPH and pentoses, also increasing the expression of *LPL* and *ATGL*, causing high triglyceride turnover.

The treatment that promoted the greatest muscle differentiation was CLA c10 t12 at the highest dose (50 μM), followed by the intermediate dose of bezafibrate (200 μM), and two doses (10 and 20 μM) of L165. The least myogenic treatment was telmisartan. Bezafibrate, L165, and telmisartan have been widely reported as agonists of *PPARβ/δ*, promoting increased expression of this gene. The activity of *PPARβ/δ* has been associated with the regulation of energy metabolism in muscle cells. This was confirmed by the study performed by Luquet et al. [2003] in which animals overexpressing *PPARβ/δ* presented a change in the amount and type of muscle fibers, from glycolytic to oxidative. This not only favored muscle fatigue resistance but also promoted an increase in the total number of fibers.

In the present study the ability of hydrocortisone to promote muscle differentiation was determined and can be explained by the analysis of the response elements found in the MRF promoters, which include a recognition site for *PPARβ/δ*, enhancing myogenesis. This was previously reported by Bonala et al. [2012], who observed that L165 promoted *PPARβ/δ* activation, increasing the expression of Gasp-1, which blocked the activity of myostatin and increased myogenesis.

Most studies report the effect of treatment with CLA c10 t12 during adipogenesis [Evans et al., 2000; Brown et al., 2001; Brown and McIntosh, 2003]; however, its effect during myogenesis has not been reported and, although we know it is a PPAR agonist, its mechanism of action could be associated with the activity of PPARβ/δ. In the present investigation, CLA c10 t12 promoted myogenesis and increased the expression of *PPARβ/δ*, but further research is necessary to confirm the mechanism of action of this compound.

The effect of CLA c10 t12 on the metabolism of carbohydrates and lipids in differentiated muscle cells has not been reported. However, as a ligand of the PPARs, it can be deduced that it might have an effect on these pathways. Increased expression of *PPARβ/δ* favored fatty acid oxidation. The increase of *ACCAβ* and *CPT1* in these results seems to be contradictory, since it is known that the first inhibits the second. However, considering that the cells were in a positive metabolic state because the culture medium used contained a high concentration of glucose, they would have been more focused on triglyceride accumulation than on oxidation. This is corroborated by the increased *G6PD* expression, indicating an active PPP for the formation of NADPH and ribose-5-phosphate.

Conclusions

The cells isolated from neonatal pigs (0–2 days of age) showed the characteristics associated with MSC populations – specifically, adhesion to plastic, being highly proliferative, genotypic and phenotypic traits, and the ability to generate mature, fully differentiated tissues. Multipotentiality was proven by successful differentiation into the adipose and muscle lineages. Different induction protocols and passages for differentiation were compared, and passages 4 and 10 were found to be the best for adipogenesis and myogenesis, respectively.

Four PPAR agonists were tested for each differentiation. The ligands with the greatest potential to promote the expression of markers of adipogenesis and myogenesis were CLA c9 t11 and CLA c10 t12, respectively.

The adipogenic effect of CLA c9 t11 was demonstrated by its ability to promote a higher rate of glycolysis, lipogenesis, and PPP; however, adipocytes retained triglyceride replacement ability, thereby limiting the exacerbated accumulation of lipids and subsequent cell atrophy. This is the first report that has shown that muscle differentiation may be associated with an increased expression of PPARβ/δ responding to its agonist CLA 10c 12t.

Acknowledgements

R.P.-S. thanks the (Mexican) National Council of Science and Technology (CoNaCyT) for a scholarship at FESC-UNAM. The authors received a grant (IN200910) from PAPIIT-UNAM. We thank Adriana González-Gallardo (Proteogenomics Facility), Nidia Hernández-Ríos (Microscopy and Image Analysis Facility) and Martín García-Servin (Vivarium) for their technical assistance, and Dorothy Pless for revising the English manuscript (all from INB-UNAM).

References

Abu-Elheiga, L., H. Wu, Z. Gu, R. Bressler, S.J. Wakil (2012) Acetyl-CoA carboxylase $2^{-/-}$ mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and de novo lipogenic conditions. J Biol Chem *287:* 12578–12588.

Adamzyk, C., T. Emonds, J. Falkenstein, R. Tolba, W. Jahnen-Dechent, B. Lethaus, S. Neuss (2013) Different culture media affect proliferation, surface epitope expression, and differentiation of ovine MSC. Stem Cells Int *2013:* 387324.

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.

Angione, A.R., C. Jiang, D. Pan, Y.X. Wang, S. Kuang S (2011) PPARδ regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. Skelet Muscle *1:* 33.

Antonitsis, P., E. Ioannidou-Papagiannaki, A. Kaidoglou, C. Papakonstantinou (2007) In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells: the role of 5-azacytidine. Interact Cardiovasc Thorac Surg *6:* 593–597.

Benjamin, S., S. Flotho, T. Börchers, F. Spener (2013) Conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids regulate peroxisome proliferator-activated receptor subtypes and major peroxisome proliferator responsive element-bearing target genes in HepG2 cell model. J Zhejiang Univ Sci B *14:* 115–123.

Bois, P.R., G.C. Grosveld (2003) FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. EMBO J *22:* 1147–1157.

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.

Boura, J.S., M. Vance, W. Yin, C. Madeira, C. Lobato da Silva, C.D. Porada, G. Almeida-Porada (2014) Evaluation of gene delivery strategies to efficiently overexpress functional HLA-G on human bone marrow stromal cells. Mol Ther Methods Clin Dev *1:* 14041.

Brodie, A.E., V.A. Manning, K.R. Ferguson, D.E. Jewell, C.Y. Hu (1999) Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. J Nutr *129:* 602–606.

Brown, J.M., M.K. McIntosh (2003) Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. J Nutr *133:* 3041–3046.

Brown, M., M. Evans, M. McIntosh (2001) Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. J Nutr Biochem *12:* 381–387.

Brückner, S., H.M. Tautenhahn, S. Winkler, P. Stock, M. Dollinger, B. Christ (2013) A fat option for the pig: hepatocytic differentiated mesenchymal stem cells for translational research. Exp Cell Res *321:* 267–275.

Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Bandesompele, C.T. Wittwer (2009) The MIQE guidelines: minimun information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem *55:* 611–622.

Cao, Z., R.M. Umek, S.L. McKnight (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Genes Dev *5:* 1538–1552.

Casado, J.G., G. Gomez-Mauricio, V. Alvarez, J. Mijares, R. Tarazona, A. Bernad, F.M. Sanchez-Margallo (2012) Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. Vet Immunol Immunopathol *147:* 104–112.

Casey, A., F. Dirks, O.D. Liang, H. Harrach, K. Schuette-Nuetgen, K. Leeman, C.F. Kim, C. Gerard, M. Subramaniam (2014) Bone marrow-derived multipotent stromal cells attenuate inflammation in obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. Stem Cells Int *2014:* 468927.

Chakrabarti, P., K.V. Kandror (2009) FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. J Biol Chem *284:* 13296–13300.

Cho, J.S., J.H. Park, J.H. Kang, S.E. Kim, I.H. Park, H.M. Lee (2014) Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stem cells in nasal polyps. Exp Biol Med (Maywood) *240:* 185–193.

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.

Comite, P., L. Cobianchi, M.A. Avanzini, S. Zonta, M. Mantelli, V. Achille, M. De Martino, L. Cansolino, C. Ferrari, M. Alessiani, R. Maccario, G.M. Gandolfo, P. Dionigi, F. Locatelli, 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, V., M.A. Gallo, F. Letizia, M. Aprile, A. Casamassimi, A. Ciccodicola (2010) PPARG: gene expression regulation and next-generation sequencing for unsolved issues. PPAR Res *2010:* 409168.

Csaki, C., U. Matis, A. Mobasheri, H. Ye, M. Shakibaei (2007) Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. Histochem Cell Biol *128:* 507–520.

Djouadi, F., J.P. Bonnefont, L. Thuillier, V. Droin, N. Khadom, A. Munnich, J. Bastin (2003) Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate. Pediatr Res *54:* 446–451.

Dueñas, F., V. Becerra, Y. Cortes, S. Vidal, L. Sáenz, J. Palomino, M. De Los Reyes, O.A. Peralta (2014) Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. BMC Vet Res *10:* 154.

Evans, M., C. Geigerman, J. Cook, L. Curtis, B. Kuebler, M. McIntosh (2000) Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. Lipids *35:* 899–910.

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.

Gao, L., F. Liu, L. Tan, T. Liu, Z. Chen, C. Shi (2014) The immunosuppressive properties of non-cultured dermal-derived mesenchymal stromal cells and the control of graft-versus-host disease. Biomaterials *35:* 3582–3588.

Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding, V. Laudet (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol Rev *58:* 685–704.

Gillis, M.H., S.K. Duckett, J.R. Sackmann (2004) Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or corn oil on fatty acid composition of adipose tissues in beef cattle. J Anim Sci *82:* 1419–1427.

Griswold, K.E., G.A. Apgar, R.A. Robinson, B.N. Jacobson, D. Johnson, H.D. Woody (2003) Effectiveness of short term feeding strategies for altering conjugated linoleic acid content of beef. J Anim Sci *81:* 1862–1871.

Haemmerle, G., A. Lass, R. Zimmermann, G. Gorkiewicz, C. Meyer, J. Rozman, G. Heldmaier, R. Maier, C. Theussl, S. Eder, D. Kratky, E.F. Wagner, M. Klingenspor, G. Hoefler, R. Zechner (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science *312:* 734–737.

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.

Kadegowda, A.K., T.A. Burns, M.C. Miller, S.K. Duckett (2013) Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 trans-9) acid in bovine adipocytes. J Anim Sci *91:* 1614–1623.

Kershaw, E.E., J.K. Hamm, L.A. Verhagen, O. Peroni, M. Katic, J.S. Flier (2006) Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. Diabetes *55:* 148–157.

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.

Kim, J.Y., K. Tillison, J.H. Lee, D.A. Rearick, C.M. Smas (2006) The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-α in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARγ. Am J Physiol Endocrinol Metab *291:* E115–E127.

Kumar, B.M., G.H. Maeng, Y.M. Lee, T.H. Kim, J.H. Lee, B.G. Jeon, S.A. Ock, J.G. Yoo, G.J. Rho (2012) Neurogenic and cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from minipig bone marrow. Res Vet Sci *93:* 749–757.

Lee, A.Y., J. Lee, C.L. Kim, K.S. Lee, S.H. Lee, N.Y. Gu, J.M. Kim, B.C. Lee, O.J. Koo, J.Y. Song, S.H. Cha (2015) Comparative studies on proliferation, molecular markers and differentiation potential of mesenchymal stem cells from various tissues (adipose, bone marrow, ear skin, abdominal skin, and lung) and maintenance of multipotency during serial passages in miniature pig. Res Vet Sci *100:* 115–124.

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.

Lodish, H (2004) Molecular Cell Biology, ed 5. New York, Freeman and Co.

Luquet, S., J. Lopez-Soriano, D. Holst, A. Fredenrich, J. Melki, M. Rassoulzadegan, P.A. Grimaldi (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. FASEB J *17:* 2299–2301.

Mathews, C.K., K.E. van Holde, K.G. Ahern (eds) (2005) Biochemistry. San Francisco, Pearson Addison Wesley.

Mathieu, M., S. Vigier, M.N. Labour, C. Jorgensen, E. Belamie, D. Noël (2014) Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres. Eur Cell Mater *28:* 82–97.

Meadus, W.J., R. MacInnis, M.E. Dugan (2002) Prolonged dietary treatment with conjugated linoleic acid stimulates porcine muscle peroxisome proliferator activated receptor gamma and glutamine-fructose aminotransferase gene expression in vivo. J Mol Endocrinol *28:* 79–86.

Meligy, F.Y., K. Shigemura, H.M. Behnsawy, M. Fujisawa, M. Kawabata, T. Shirakawa (2012) The efficiency of in vitro isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. In Vitro Cell Dev Biol Anim *48:* 203–215.

Morak, M., H. Schmidinger, G. Riesenhuber, G.N. Rechberger, M. Kollroser, G. Haemmerle, R. Zechner, F. Kronenberg, A. Hermetter (2012) Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues. Mol Cell Proteomics *11:* 1777–1789.

Moscoso, I., A. Centeno, E. López, J.I. Rodriguez-Barbosa, I. Santamarina, P. Filgueira, M.J. Sánchez, R. Domínguez-Perles, G. Peñuelas-Rivas, N. Domenech (2005) Differentiation 'in vitro' of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. Transplant Proc *37:* 481–482.

Musri, M.M., R. Gomis, M. Párrizas (2007) Chromatin and chromatin-modifying proteins in adipogenesis. Biochem Cell Biol *85:* 397–410.

Nandy, S.B., S. Mohanty, M. Singh, M. Behari, B. Airan (2014) Fibroblast growth factor-2 alone as an efficient inducer for differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neurons. J Biomed Sci *21:* 83.

Ock S.A., R. Baregundi Subbarao, Y.M. Lee, J.H. Lee, R.H. Jeon, S.L. Lee, J.K. Park, S.C. Hwang, G.J. Rho (2016) Comparison of immunomodulation properties of porcine mesenchymal stromal/stem cells derived from the bone marrow, adipose tissue, and dermal skin tissue. Stem Cells Int *2016:* 9581350.

Okuno, Y., K. Inoue, Y. Imai (2013) Novel insights into histone modifiers in adipogenesis. Adipocyte *2:* 285–288.

Peterbauer-Scherb, A., M. van Griensven, A. Meinl, C. Gabriel, H. Redl, S. Wolbank (2010) Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration. J Tissue Eng Regen Med *4:* 485–490.

Pisani, D.F., C.A. Dechesne, S. Sacconi, S. Delplace, N. Belmonte, O. Cochet, N. Clement, B. Wdziekonski, A.P. Villageois, C. Butori, C. Bagnis, J.P. Di Santo, J.Y. Kurzenne, C. Desnuelle, C. Dani (2010) Isolation of a highly myogenic CD34-negative subset of human skeletal muscle cells free of adipogenic potential. Stem Cells *28:* 753–764.

Poulsen, L.l., M. Siersbæk, S. Mandrup (2012) PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. Semin Cell Dev Biol *23:* 631–639.

Ringe, J., C. Kaps, B. Schmitt, K. Büscher, J. Bartel, H. Smolian, O. Schultz, G.R. Burmester, T. Häupl, M. Sittinger (2002) Porcine mesenchymal stem cells: induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res *307:* 321–327.

Rogue, A., C. Spire, M. Brun, N. Claude, A. Guillouzo (2010) Gene expression changes induced by PPAR gamma agonists in animal and human liver. PPAR Res *2010:* 325183.

Rosen, E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver, B.M. Spiegelman (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev *14:* 1293–1307.

Rozwadowska, N., T. Kolanowski, E. Wiland, M. Siatkowski, P. Pawlak, A. Malcher, T. Mietkiewski, M. Olszewska, M. Kurpisz (2013) Characterisation of nuclear architectural alterations during in vitro differentiation of human stem cells of myogenic origin. PLoS One *8:* e73231.

Ruijtenberg S., S. van den Heuvel (2016) Coordinating cell proliferation and differentiation: antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. Cell Cycle *15:* 196–212.

SAS Institute (2008) SAS OnlineDoc. 9.1.3. Cary, SAS Institute Inc.

Siegel G., T. Kluba, U. Hermanutz-Klein, K. Bieback, H. Northoff, R. Schäfer (2013) Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. BMC Med *11:* 146.

Son, C., K. Hosoda, J. Matsuda, J. Fujikura, S. Yonemitsu, H. Iwakura, H. Masuzaki, Y. Ogawa, T. Hayashi, H. Itoh, H. Nishimura, G. Inoue, Y. Yoshimasa, Y. Yamori, K. Nakao (2001) Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes. Endocrinology *142:* 4189–4194.

Song, S.H., B.M. Kumar, E.J. Kang, Y.M. Lee, T.H. Kim, S.A. Ock, S.L. Lee, B.G. Jeon, G.J. Rho (2011) Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation in vitro into putative oocyte-like cells. Stem Cells Dev *20:* 1359–1370.

Szczerbal, I., H.A. Foster, J.M. Bridger (2009) The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system. Chromosoma *118:* 647–663.

Tang, L., Y. Yin, H. Zhou, G. Song, A. Fan, B. Tang, W. Shi, Z. Li (2012) Proliferative capacity and pluripotent characteristics of porcine adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow. Cell Reprogram *14:* 342–352.

Tomita, S., D.A. Mickle, R.D. Weisel, Z.Q. Jia, L.C. Tumiati, Y. Allidina, P. Liu, R.K. Li (2002) Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg *123:* 1132–1140.

Travers, M.T., M.C. Barber (2001) Acetyl-CoA carboxylase-α: gene structure-function relationships. J Anim Sci *79:* E136–E143.

Tsuzuki, T., I. Ikeda (2007) Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat intestines, and similar absorption rates of 9c,11t-conjugated linoleic acid and 10t,12c-conjugated linoleic acid. Biosci Biotechnol Biochem *71:* 2034–2040.

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

Wang, D., A. Haile, L.C. Jones (2011) Rosiglitazone-induced adipogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line – biomed 2011. Biomed Sci Instrum *47:* 213–221.
Wang, P.Y., L.R. Clements, H. Thissen, W.B. Tsai, N.H. Voelcker (2014a) Screening rat mesenchymal stem cell attachment and differentiation on surface chemistries using plasma polymer gradients. Acta Biomater *11:* 58–67.
Wang, Y.P., L.S. Zhou, Y.Z. Zhao, S.W. Wang, L.L. Chen, L.X. Liu, Z.Q. Ling, F.J. Hu, Y.P. Sun, J.Y. Zhang, C. Yang, Y. Yang, Y. Xiong, K.L. Guan, D. Ye (2014b) Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. EMBO J *33:* 1304–1320.
Wen, Y., P. Bi, W. Liu, A. Asakura, C. Keller, S. Kuang (2012) Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. Mol Cell Biol *32:* 2300–2311.
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.
Xu, W., X. Zhang, H. Qian, W. Zhu, X. Sun, J. Hu, H. Zhou, Y. Chen (2004) Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med (Maywood) *229:* 623–631.
Yoon, D.S., Y.H. Kim, H.S. Jung, S. Paik, J.W. Lee (2011) Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. Cell Prolif *44:* 428–440.
Zeng, L., E. Rahrmann, Q. Hu, T. Lund, L. Sandquist, M. Felten, T.D. O'Brien, J. Zhang, C. Verfaillie (2006) Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. Stem Cells *24:* 2355–2366.
Zhai, J.J., Z.L. Liu, J.M. Li, J.P. Chen, L. Jiang, D.M. Wang, J. Yuan, J.G. Shen, D.P. Yang, J.Q. Chen (2010) Different mechanisms of *cis*-9,*trans*-11- and *trans*-10,*cis*-12- conjugated linoleic acid affecting lipid metabolism in 3T3-L1 cells. J Nutr Biochem *21:* 1099–1105.
Zhang, Y., Y. Chu, W. Shen, Z. Dou (2009) Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. Interact Cardiovasc Thorac Surg *9:* 943–946.
Zhao Z.B., Y. Liu, Y. Yao (2014) Computational determination of binding structures and free energies of glucose 6-phosphate dehydrogenase with novel steroid inhibitors. J Mol Graph Model *51:* 168–172.

PROOF

DISCUSIÓN

En la presente investigación se obtuvieron cultivos de MSC aislados de medula ósea de cerdos neonatos y las células fueron diferenciadas con éxito al linaje adiposo y muscular mediante la utilización de agonistas de PPARs, Posteriormente se determinó que el metabolismo energético fue orientado dichos tipos celulares.

1. Establecimiento de un sistema de cultivo primario de MSC de la médula ósea de cerdos

El método de extracción y aislamiento presentó el inconveniente de acarrear una alta población de eritrocitos, sin embargo, fue efectivo al aislar células viables para su posterior cultivo. Dicha contaminación, fue eliminada mediante lavados y subcultivos fijos, en virtud de que las MSC presentan la capacidad de adherencia al plástico (Dominici *et al*., 2006).

El cultivo celular mantuvo la viabilidad de las células durante periodos prolongados presentando una elevada capacidad de proliferación, los resultados son similares a los obtenidos por Tang *et al.* (2012) donde aislaron las MSC y las mantuvieron en cultivo durante 20 pasajes.

La presente investigación identifico la población aislada por 5 criterios; la adherencia al plástico, la capacidad proliferativa, la expresión de factores de transcripción considerados como marcadores de MSC, expresión de marcadores de superficies que son asociados a las células troncales y la multipotencialidad.

Referente a la capacidad proliferativa, las células se mantuvieron en cultivo durante 48 días, datos similares a los obtenidos por Sarugaser *et al.* (2009) donde aislaron MSC de la médula ósea de humanos registrando 10 pasajes durante 50-70 días.

El número de duplicaciones obtenidas en esta investigación, corrobora los datos obtenidos por Colleoni *et al.* (2005) donde reportaron 15 pasajes para MSC de cerdo y bovinos con 40 y 50 duplicaciones acumuladas, respectivamente. Para el pasaje 10, las células comenzaron a decaer en su potencial proliferativo, esta disminución es asociada al proceso de senescencia al que se enfrentan las células.

Para el caso del tiempo de duplicación, los registros obtenidos difieren a los reportados por Peterbauer-Scherb *et al.* (2010) donde aislaron MSC de cerdos a partir de la médula ósea y registraron entre 50-55 horas para la duplicación celular durante 100 días de cultivo. Los datos obtenidos en la presente investigación son de 1.5 días (36 horas) para cada duplicación.

Otro criterio para identificar la población cultivada como MSC fue la expresión positiva a Oct4 y Nanog, los cuales son marcadores de pluripotencialidad (Li *et al.*, 2013). A diferencia de lo mencionado por Vejlsted *et al.* (2006) donde indicaron que la expresión de Oct4 está restringido al estado de blastocito en la masa celular interna, sin embargo, en esta investigación fue posible determinar la expresión en células aisladas de cerdos neonatos.

Estos datos son similares a los reportados por Tang *et al.* (2012) donde demostraron la expresión de Oct4, Nanog, Sox2 y c-Myc en células aisladas de la médula ósea de cerdos.

La expresión positiva a los marcadores de superficie (CD90, CD44, CD45 y ABCG2) y la identificación de los antígenos por inmunocitoquímica, permitió deducir que el fenotipo de las células cultivadas, caracterizándose como una población con similitudes a MSC, esto comprueba los datos de Casado *et al.* (2012) donde por medio de inmunocitoquímica identificaron la expresión de los marcadores antes mencionados.

2. Inducir la diferenciación hacia los linajes muscular y adiposo y 3. Medir la expresión de los factores de transcripción PPARγ (adipogénesis) y myod1 o cadena pesada de miosina (MYHC) (miogénesis) mediante $2^{-\Delta\Delta ct.}$

Adipogénesis

El protocolo promovió la adipogénesis a partir de las MSC. Tomando como referencia que las células se encuentran en un estado de represión génica y que requieren del estímulo idóneo para activar la expresión de los genes involucrados.

En la presente investigación se determinó la expresión positiva de PPARγ en las células tratadas, comprobando que fueron diferenciadas hasta adipocitos maduros. Estos datos coinciden con los reportados por Szczerbal *et al.* (2009) donde registraron los niveles de expresión de los genes involucrados durante la adipogénesis (PPARγ, SREBF1, FABP4, C/EBPα, C/EBPβ, C/EBPδ, y GATA2). La expresión de GATA2, C/EBPβ y C/EBPδ se registró para el día 7 y para PPARγ, C/EBPα y FABP4 al final del tratamiento.

La expresión relativa de PPARγ en esta investigación es similar a los resultados reportados para el pasaje 2 en el experimento de Ringe *et al.* (2002) donde determinaron la expresión de este gen en el mismo modelo experimental.

Miogénesis

Los protocolos 2 y 3, indujeron la diferenciación muscular a partir de MSC, esto se determinó mediante la expresión positiva de MyoD y MYHC.

Para la previa selección del protocolo 2, fue necesaria la revisión de artículos publicados mostrando una heterogeneidad en cuanto a los reactivos usados, motivo por el cual se decidió adaptar un medio nuevo (Tomita *et al.,* 2002; Xu *et al.,* 2004; Moscoso *et al.,* 2005; Antonitsis *et al.,* 2007; Zhang *et al.,* 2009; Meligy *et al.,* 2012). En el caso del protocolo 3 se utilizó el medio reportado por Gang *et al.* (2004) donde ocuparon MSC aisladas de sangre de cordón umbilical determinando la expresión de MyoD1 y miogenina.

La mayoría de las investigaciones utilizan a la 5-azacitidina como agente desmetilante, promoviendo así el libre acceso al ADN y facilitando la expresión de los MRFs. Un ejemplo de lo anterior es la investigación de Zhang *et al.* (2009) donde determinaron la diferenciación positiva a miocitos a partir de células MSC de médula ósea de fetos humanos.

En la presente investigación se midió MyoD1 como marcador de diferenciación muscular, el cual pertenece a los MRFs y es considerado como un gen intermedio dentro de la miogénesis (Lodish *et al.,* 2004), sin embargo, la expresión de MYHC fue baja. Con los datos obtenidos se puede determinar que la 5-azacitidina compromete las MSC al linaje muscular sin completar la fase de maduración.

Los resultados obtenidos con el protocolo 3, son los primeros en reportar la diferenciación de MSC aisladas de la médula ósea de cerdos neonatos a miocitos por acción de la hidrocortisona. El mecanismo de acción de la hidrocortisona para favorecer la miogénesis, fue dilucidado por la identificación de los promotores de los MRFs (Myf5, Myod1 y miogenina), los cuales indicaron la presencia de elementos de respuesta para las tres isoformas de los PPARs y los glucocorticoides.

4. Promover la adipogénesis y miogénesis mediante el uso de agonistas de PPARs, determinando el efecto sobre el metabolismo energético en ambos tipos celulares.

Adipogénesis

En el presente estudio, el tratamiento que registro la mayor expresión de PPARγ fue el ALC 9´cis 11´trans, esto confirma los resultados del experimento de Sakuma *et al.* (2010) quienes midieron los niveles de expresión para este gen y determinaron un aumento significativo con respecto al control. Meadus *et al.* (2002) llevaron a cabo un experimento *in vivo* donde alimentaron cerdos con una mezcla de ALC y midieron los niveles de expresión de PPARγ en muestras tomadas del músculo y grasa subcutánea, los resultados indicaron que efectivamente la adición del ALC promovió la expresión de este gen aumentando significativamente el porcentaje de tejido adiposo en el animal.

Estos resultados son contradictorios a los obtenidos por Brodie *et al.* (1999) donde alimentaron a cerdos con una mezcla de ALC y midieron los niveles de PPARγ y C/EBPα así como la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, en los tres casos la modulación fue negativa concluyendo que el ALC inhibía el proceso de adipogénesis. Es importante resaltar que como dichos experimentos existen varios (Dugan *et al.,* 1997; Griswold *et al.,* 2003; Gillis *et al.,* 2004) que no identifican los porcentajes de los isómeros adicionados sino son manejados como una mezcla desconocida.

Si bien se sabe que el isómero 9´cis 11´trans promueve la adipogénesis, cuando se ha utilizado al isómero purificado 10´cis 12´trans la respuesta es contraria, deteniendo la adipogénesis y la acumulación de triglicéridos en los preadipocitos. El experimento de Brown *et al.* (2001) determinaron que al adicionar el isómero 10´cis 12´trans se acentúa la tasa de adipogénesis, sin embargo, otro grupo observó que se suprime la acumulación de triglicéridos en preadipocitos 3T3-L1 (Evans *et al.,* 2000).

Los resultados obtenidos en la presente investigación corroboran el efecto dual del ALC dependiendo del isómero utilizado. Cuando se adiciona ALC 9´cis 11´trans efectivamente se observa una expresión de PPARγ positiva, dosis dependiente, en comparación con el 10´cis

12´trans donde los niveles de expresión para el mismo gen se mantuvieron iguales que los controles.

En el caso de la rosiglitazona, la dosis intermedia (10µM) fue la que mostró mayor potencial adipogénico, este resultado es similar al obtenido por Wang *et al.* (2011) donde probaron 0.1, 1, 10 y 30 µM de rosiglitazona, siendo las dosis de 10 a 30 µM las de mayor efecto adipogénico.

El tratamiento con telmisartan registro niveles menores de expresión de PPARγ, este efecto puede ser consecuencia de la distinta forma de modular la adipogénesis, la cual se ha documentado como modesta al tener acúmulos de grasa disminuidos en comparación a tratamientos con TZD, lo anterior lo comprobó Schupp *et al.* (2005) donde reportaron que el telmisartan activa selectivamente a PPARγ reclutando coactivadores distintos lo que modula el grado de acumulación de triglicéridos durante la adipogénesis.

El tratamiento con ALC 9´cis 11´trans aumento los niveles de expresión de la HX2, esta enzima está involucrada en la glucólisis y es la encargada de fosforilar la glucosa que ingresa a la célula, consumiendo una molécula de ATP y requiriendo del acoplamiento de Mg2+. La regulación metabólica de la HX2 es mediante su producto, la glucosa-6-fosfato, y cuando éste se acumula, la actividad y expresión de la HX2 disminuye (Mathews, 2002). Para la PFK, el ALC 9´cis 11´trans, tuvo un efecto negativo disminuyendo los niveles de expresión. La regulación de la PFK está controlada por los niveles de ATP, citrato y ácidos grasos (Mathews, 2002).

Para la enzima ACCA el efecto fue contrario para las dos isozimas, registrando un aumento en la expresión la ACCAa y una disminución la ACCAb. La ACCAa está involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos al catalizar la formación de malonil-CoA mediante la utilización de una molécula de ATP y biotina como cofactor (Locke *et al.,* 2008). Es regulada positivamente por una alta concentración de citrato y bicarbonato. Su expresión es principalmente en el hígado y tejido adiposo y su ubicación intracelular es restringida al citoplasma (Liu *et al.*, 2008). La ACCAb está involucrada en la oxidación de los ácidos grasos modulando la tasa de la β-oxidación y es expresada en mayor grado por el músculo ubicándose intra mitocondrial (Abu-Elheiga *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008).

En cuanto a la expresión de la ATGL y LPL se registró un aumento con el tratamiento. En el experimento realizado por Kershaw *et al.* (2006) reportó un aumento en los niveles de expresión en células 3T3-L1 durante la adipogénesis, así como una tasa de recambio elevada de triglicéridos. Experimentos realizados tanto *in vivo* (Haemmerle *et al.*, 2006) como *in vitro* (Kershaw *et al.*, 2006) han reportado que la expresión de la ATGL está bajo el control de PPARγ y Foxo1 (Kim et.al, 2009). Es relacionado el grado de capacidad lipolítica con los niveles de expresión de ATGL en los adipocitos (Xu y Xu, 2008; Chakrabarti y Kandror, 2009) El trabajo realizado por Morak *et al.* (2012) demostró que una expresión baja de la ATGL en adipocitos ocasiona una trastorno en el balance de acumulación y liberación de triglicéridos lo que resulta en una célula atrofiada y disfuncional.

En cuanto a la G6PD el tratamiento aumentó los niveles de expresión. Dicha enzima es la primera de la ruta de las pentosas, cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (Zhi-Bo *et al.,* 2014). La G6PD es una enzima clave que modula la tasa metabólica de la vías de las pentosas (Wang *et al.,* 2014), ruta que provee al organismo de NADPH, el cual está involucrado en varios procesos biológicos pero principalmente como donador de equivalentes reductores para la síntesis de ácidos grasos (Mathews, 2002) y ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos. La actividad de la G6PD tiene un papel fundamental para contrarrestar el estrés oxidativo manteniendo un medio reducido propicio para el correcto funcionamiento de la célula (Wang *et al.,* 2014).

Con la información anterior y los resultados obtenidos en la presente investigación, se pude deducir que las células diferenciadas hacia el linaje adiposo presentan una elevada tasa glucolítica favoreciendo el acumulo de ATP, el cual sirve como señal metabólica para desencadenar la síntesis de ácidos grasos aumentando la lipogénesis, sin embargo la célula modula la cantidad de triglicéridos almacenados por un lado inhibiendo la expresión de la PFK cambiando la dirección de la glucosa-6-fosfato a las vías de pentosas para generar NADPH y aumentando la expresión de ATGL y LPL, ocasionando un recambio elevado de los triglicéridos

Miogénesis

El tratamiento que promovió en mayor grado la diferenciación muscular fue el ALC 10´ 12´ en la dosis alta (50μM). Se ha asociado a la actividad de PPARβ/δ la función de modular el metabolismo energético de las células musculares. Lo anterior lo comprobó el trabajo de Luquet *et al.* (2003) cuando generaron animales con una sobre expresión de PPARβ/δ demostrado un cambio en la cantidad y tipo de fibras musculares, pasando de glucolíticas a oxidativas. Lo anterior no solo favoreció la resistencia a la fatiga muscular, sino también, promovió un aumento en el número total de fibras.

El efecto de promover una mayor diferenciación muscular puede ser explicado mediante los resultados obtenidos del análisis de los elementos de respuestas de los MRFs en la presente investigación, donde se pudo constatar que existe reconocimiento para el factor de transcripción PPARβ/δ los que podría estar favoreciendo la miogénesis. Lo anterior fue corroborado por Bonala *et al.* (2012) donde determinaron que al utilizar L-165 se promovió la activación de PPARβ/δ aumentando la expresión de Gasp-1, lo que bloqueó la actividad de la miostatina e incrementó la miogénesis.

Se han reportado efectos principalmente durante la adipogénesis cuando se tratan las células con ALC 10´ 12´ (Evans *et al.,* 2000; Brown *et al.,* 2001; Brown y McIntosh, 2003), sin embargo, no se ha estudiado el efecto durante la miogénesis, y si bien se sabe que es un agonista de PPARγ, su mecanismo de acción podría estar asociado a la actividad de PPARβ/δ.

En la presente investigación se obtuvo un aumento en la expresión de PPARβ/δ durante el tratamiento con ACL 10’12’, lo que corrobora lo deducido anteriormente.

El tratamiento con ALC 10´12´ promovió un aumento en la expresión de PFK, ACCAb, G6PD, CPT1b y no existió cambio para HX2 y ACCAa.

En la actualidad no existen reportes del efecto del ALC 10´12´sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos. Sin embargo al ser un ligando de los PPARs es posible deducir que tiene un efecto sobre estas rutas metabólicas.

Al aumentar la expresión de PPARβ/δ se favoreció la oxidación de los ácidos grasos. Los resultados para ACCAb parecen contradecir al aumento de la CPT1b debido a que este es inhibido por el primero, pero tomando en cuenta que las células se encontraban en una estado metabólico positivo debido a que el medio de cultivo utilizado consta de una concentración elevada de glucosa, las células estarían más orientadas en la acumulación de triglicéridos que a la oxidación. Esto se ve corroborado por el aumento en la G6PD que indica una activa vía de las pentosas para la formación de NAPDH y ribosa-5-fosfato.

CONCLUSIÓN

Las células obtenidas de la médula ósea de cerdos de 0-2 días edad presentan las cinco características asociadas a las células troncales Se determinó la alta capacidad proliferativa, la expresión positiva de los genes conocidos como marcadores de pluripotencialidad y la reactividad positiva a los anticuerpos asociados a MSC.

Se comprobó la multipotencialidad, al ser diferenciadas exitosamente hacia el linaje adiposo y muscular. Fue posible determinar los protocolos de inducción y pasajes idóneos de diferenciación siendo el 4 y el 10 para la adipogénesis y miogénesis, respectivamente.

Se probaron cuatro agonistas de los PPARs para cada diferenciación. Registrándose que el ALC 9´cis 11´trans como el ligando con mayor potencial para la adipogénesis y el ALC 10´cis 12´trans para la miogénesis.

Los resultados obtenidos demostraron el efecto adipogénico del ligando ALC 9´11´al promover una mayor tasa de glucólisis, lipogénesis y vía de las pentosas, sin embargo los adipocitos mantienen un freno en la acumulación de triglicéridos lo que les permite tener un recambio contante de los mismos.

Para el caso de la ALC 10´12’ se reportó que el mecanismo de diferenciación muscular puede estar asociado al aumento en la expresión de PPARβ/δ promoviendo fibras oxidativas, sin embargo la tasa glucolítica fue aumentada sin modificar la captación de glucosa y que esta producción de ATP oriento a las células a la acumulación de triglicéridos con una baja activación de la β-oxidación.

LITERATURA CITADA

Abu-Elheiga L, Wu H, Gu Z, Bressler R, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2-/- mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and de novo lipogenic conditions. J Biol Chem. 2012 Apr 6;287(15):12578-88. Doi:10.1074/jbc.M111.309559.

Albini S, Coutinho Toto P, Dall'Agnese A, Malecova B, Cenciarelli C, Felsani A, Caruso M, Bultman SJ, Puri PL. Brahma is required for cell cycle arrest and late muscle gene expression during skeletal myogenesis. EMBO Rep. 2015 Aug;16(8):1037-50. doi: 10.15252/embr.201540159.

Angione AR, Jiang C, Pan D, Wang YX, Kuang S. PPARδ regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. Skelet Muscle. 2011 Nov 1;1(1):33. doi: 10.1186/2044-5040-1-33.

Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2007 Oct;6(5):593-7.

Belda BJ, Thompson JT, Sinha R, Prabhu KS, Vanden Heuvel JP. The dietary fatty acid 10E12Z-CLA induces epiregulin expression through COX-2 dependent PGF(2α) synthesis in adipocytes. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2012 Oct;99(1-2):30-7. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2012.05.001.

Benjamin S, Flotho S, Börchers T, Spener F. Conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids regulate peroxisome proliferator-activated receptor subtypes and major peroxisome proliferator responsive element-bearing target genes in HepG2 cell model. J Zhejiang Univ Sci B. 2013 Feb;14(2):115-23. doi: 10.1631/jzus.B1200175

Bois PR, Grosveld GC. FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. EMBO J. 2003 Mar 3;22(5):1147-57.

Bonala S, Lokireddy S, Arigela H, Teng S, Wahli W, Sharma M, McFarlane C, Kambadur R. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ induces myogenesis by modulating myostatin activity. J Biol Chem. 2012 Apr 13;287(16):12935-51. doi: 10.1074/jbc.M111.319145.

Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. Mol Aspects Med. 2004 Oct-Dec;25(5-6):495-520.

Brandebourg TD, Hu CY. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. J Anim Sci. 2005 Sep;83(9):2096-105.

Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. J Nutr. 1999 Mar;129(3):602-6. PubMed PMID: 10082762.

Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh MK. Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. J Lipid Res. 2003 Jul;44(7):1287-300.

Brown JM, McIntosh MK. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. J Nutr. 2003. 133(10):3041-6.

Brown M, Evans M, McIntosh M. Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. J Nutr Biochem. 2001 Jul;12(7):381-387.

Cabrero A, Alegret M, Sánchez R, Adzet T, Laguna J, Vázquez M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor a (PPARa) Activators, Bezafibrate and Wy-14,643, Increase Uncoupling Protein-3 mRNA Levels without Modifying the Mitochondrial Membrane Potential in Primary Culture of Rat Preadipocytes. Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 380, No. 2, August 15, pp. 353–359, 2000 doi:10.1006/abbi.2000.1927

Calvar C, Deutsch SI, Intebi AD. [Glucocorticoid resistance syndrome]. Medicina (B Aires). 1997;57(2):247-50. Spanish.

Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Genes Dev. 1991 Sep;5(9):1538-52.

Casado JG, Gomez-Mauricio G, Alvarez V, Mijares J, Tarazona R, Bernad A, Sanchez-Margallo FM. Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Jun 15;147(1-2):104-12. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.03.015.

Chakrabarti P, Kandror KV. FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. J Biol Chem. 2009 May 15;284(20):13296-300. doi: 10.1074/jbc.C800241200.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell. 2003 May 30;113(5):643-55.

Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, Rastinejad F. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. Nature. 2008 Nov 20;456(7220):350-6. doi: 10.1038/nature07413.

Cianchetti S, Del Fiorentino A, Colognato R, Di Stefano R, Franzoni F, Pedrinelli R. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of telmisartan in cultured human umbilical vein endothelial cells. Atherosclerosis. 2008 May;198(1):22-8.

Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, Duchi R, Galli C, Lazzari G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. Cloning Stem Cells. 2005;7(3):154-66.

Contreras AV, Torres N, Tovar AR. PPAR-α as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. Adv Nutr. 2013 Jul 1;4(4):439-52. doi: 10.3945/an.113.003798.

Cordero González Gustavo. Utilización De Ácido Linoleico Conjugado en Alimentación Porcina. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria Departamento de Producción Animal. Madrid, España 2011.

Costa V, Gallo MA, Letizia F, Aprile M, Casamassimi A, Ciccodicola A. PPARG: Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. PPAR Res. 2010;2010. pii: 409168. doi: 10.1155/2010/409168. Epub 2010 Sep 8.

Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. Histochem Cell Biol. 2007 Dec;128(6):507-20.

Ding J, Xu H, Faiola F, Ma'ayan A, Wang J. Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network. Cell Res. 2012 Jan;22(1):155-67. doi: 10.1038/cr.2011.179.

Djouadi F, Bonnefont JP, Thuillier L, Droin V, Khadom N, Munnich A, Bastin J. Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate. Pediatr Res. 2003 Oct;54(4):446-51

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Schaefer, A. L., & Kramer, J. K. G. (1997). The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. Canadian Journal of Animal Science, 77(4), 723-725.

Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. Lipids. 2000 Aug;35(8):899-910.

Feng X, Luo Z, Ma L, Ma S, Yang D, Zhao Z, Yan Z, He H, Cao T, Liu D, Zhu Z. Angiotensin II receptor blocker telmisartan enhances running endurance of skeletal muscle through activation of the PPAR-δ/AMPK pathway. J Cell Mol Med. 2011 Jul;15(7):1572-81. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01085.x.

Fernández AJ y Hernández AM. Fibratos: efectos farmacológicos. Clin Invest Arterioscl. 2012;24(Supl 1):19-23

Festuccia WT, Laplante M, Brûlé S, Houde VP, Achouba A, Lachance D, Pedrosa ML, Silva ME, Guerra-Sá R, Couet J, Arsenault M, Marette A, Deshaies Y. Rosiglitazone-induced heart remodelling is associated with enhanced turnover of myofibrillar protein and mTOR activation. J Mol Cell Cardiol. 2009 Jul;47(1):85-95. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.04.011.

Freshney, R. I. Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2005 doi: 10.1002/0471741817.ch1

Furukawa H, Mawatari K, Koyama K, Yasui S, Morizumi R, Shimohata T, Harada N, Takahashi A, Nakaya Y. 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. 2011 Jun 25;660(2-3):485-91. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.04.008.

Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. Stem Cells. 2004;22(4):617-24.

Gavish D, Leibovitz E, Shapira I, Rubinstein A. Bezafibrate and simvastatin combination therapy for diabetic dyslipidaemia: efficacy and safety. J Intern Med. 2000 May;247(5):563-9.

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):685-704.

Gillis MH, Duckett SK, Sackmann JR. Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or corn oil on fatty acid composition of adipose tissues in beef cattle. J Anim Sci. 2004 May;82(5):1419-27.

Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. Methods Mol Biol. 2009;482:281-94. doi: 10.1007/978-1-59745-060-7_18.

Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron. 2003 Aug 28;39(5):749-65.

Griswold KE, Apgar GA, Robinson RA, Jacobson BN, Johnson D, Woody HD. Effectiveness of short-term feeding strategies for altering conjugated linoleic acid content of beef. J Anim Sci. 2003 Jul;81(7):1862-71.

Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science. 2006 May 5;312(5774):734-7.

Han ZX, Shi Q, Wang DK, Li D, Lyu M. [Basic biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human umbilical cord]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2013 Oct;21(5):1248-55. doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2013.05.033.

Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. ScientificWorldJournal. 2013 Aug 27;2013:632972. doi: 10.1155/2013/632972. eCollection 2013.

He H, Yang D, Ma L, Luo Z, Ma S, Feng X, Cao T, Yan Z, Liu D, Tepel M, Zhu Z. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. Hypertension. 2010 Apr;55(4):869-79. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143958.

Hepperger C, Mannes A, Merz J, Peters J, Dietzel S. Three-dimensional positioning of genes in mouse cell nuclei. Chromosoma. 2008 Dec;117(6):535-51. doi: 10.1007/s00412-008-0168-2.

Hewitt KJ, Shamis Y, Hayman RB, Margvelashvili M, Dong S, Carlson MW, Garlick JA. Epigenetic and phenotypic profile of fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. PLoS One. 2011 Feb 28;6(2):e17128. doi: 10.1371/journal.pone.0017128.

Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. Domest Anim Endocrinol. 2002 Mar;22(1):1-23.

Jack BH, Crossley M. GATA proteins work together with friend of GATA (FOG) and C-terminal binding protein (CTBP) co-regulators to control adipogenesis. J Biol Chem. 2010 Oct 15;285(42):32405-14. doi: 10.1074/jbc.M110.141317.

Kadegowda AK, Burns TA, Miller MC, Duckett SK. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 trans-9) acid in bovine adipocytes. J Anim Sci. 2013 Apr;91(4):1614-23. doi: 10.2527/jas.2012-5590.

Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M, Flier JS. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. Diabetes. 2006 Jan;55(1):148-57.

Kim JJ, Li P, Huntley J, Chang JP, Arden KC, Olefsky JM. FoxO1 haploinsufficiency protects against high-fat diet-induced insulin resistance with enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in adipose tissue. Diabetes. 2009 Jun;58(6):1275-82. doi: 10.2337/db08-1001.

Kumar BM, Maeng GH, Lee YM, Kim TH, Lee JH, Jeon BG, Ock SA, Yoo JG, Rho GJ. Neurogenic and cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from minipig bone marrow. Res Vet Sci. 2012 Oct;93(2):749-57. doi:10.1016/j.rvsc.2011.09.012.

Laforêt P, Vianey-Saban C. Disorders of muscle lipid metabolism: diagnostic and therapeutic challenges. Neuromuscul Disord. 2010 Nov;20(11):693-700. doi: 10.1016/j.nmd.2010.06.018.

Li D, Li S, Zhao J. Screening of xanthine oxidase inhibitors in complex mixtures using online HPLC coupled with postcolumn fluorescence-based biochemical detection. J Sep Sci. 2014 Feb;37(4):338-44. doi: 10.1002/jssc.201301207.

Li Z, Tian X, Yuan Y, Song Z, Zhang L, Wang X, Li T. Effect of cell culture using chitosan membranes on stemness marker genes in mesenchymal stem cells. Mol Med Rep. 2013 Jun;7(6):1945-9. doi: 10.3892/mmr.2013.1423.

Liu X, Fortin PD, Walsh CT. Andrimid producers encode an acetyl-CoA carboxyltransferase subunit resistant to the action of the antibiotic. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 9;105(36):13321-6. doi: 10.1073/pnas.0806873105.

Locke BR, Kinsey ST. Diffusional constraints on energy metabolism in skeletal muscle. J Theor Biol. 2008 Sep 21;254(2):417-29. doi: 10.1016/j.jtbi.2008.06.008.

Lodish H. Molecular cell biology. 5th edition. W. H. Freeman and Company, New York. 2004.

Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? Steroids. 2010 Aug-Sep;75(8-9):585-94. doi: 10.1016/j.steroids.2009.10.012.

Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. FASEB J. 2003 Dec;17(15):2299-301.

Mathews Christopher K., K. E. Van Holde, Kevin G. Ahern, Bioquímica, Translated by José Manuel González de Buitrago, Edition illustrated, Pearson Educación, 2002, ISBN 8478290532, 9788478290536, 1335 pages

Meadus WJ, MacInnis R, Dugan ME. Prolonged dietary treatment with conjugated linoleic acid stimulates porcine muscle peroxisome proliferator activated receptor gamma and glutamine-fructose aminotransferase gene expression in vivo. J Mol Endocrinol. 2002 Apr;28(2):79-86.

Meligy FY, Shigemura K, Behnsawy HM, Fujisawa M, Kawabata M, Shirakawa T. The efficiency of in vitro isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2012 Apr;48(4):203-15. doi: 10.1007/s11626-012-9488-x.

Monaco E, Bionaz M, Sobreira de Lima A, Hurley WL, Loor JJ, Wheeler MB. Selection and reliability of internal reference genes for quantitative PCR verification of transcriptomics during the differentiation process of porcine adult mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2010 Mar 30;1(1):7. doi: 10.1186/scrt7.

Montserrat N, Ramírez-Bajo MJ, Xia Y, Sancho-Martinez I, Moya-Rull D, Miquel-Serra L, Yang S, Nivet E, Cortina C, González F, Izpisua Belmonte JC, Campistol JM. Generation of induced pluripotent stem cells from human renal proximal tubular cells with only two transcription factors, OCT4 and SOX2. J Biol Chem. 2012 Jul 13;287(29):24131-8. doi: 10.1074/jbc.M112.350413.

Morak M, Schmidinger H, Riesenhuber G, Rechberger GN, Kollroser M, Haemmerle G, Zechner R, Kronenberg F, Hermetter A. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues. Mol Cell Proteomics. 2012 Dec;11(12):1777-89. doi: 10.1074/mcp.M111.015743.

Moscoso I, Centeno A, López E, Rodriguez-Barbosa JI, Santamarina I, Filgueira P, Sánchez MJ, Domínguez-Perles R, Peñuelas-Rivas G, Domenech N. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):481-2.

Musri MM, Gomis R, Párrizas M. Chromatin and chromatin-modifying proteins in adipogenesis. Biochem Cell Biol. 2007 Aug;85(4):397-410. Review. PubMed PMID:17713575.

Ninomiya Y, Sugahara-Yamashita Y, Nakachi Y, Tokuzawa Y, Okazaki Y, Nishiyama M. Development of a rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 2;394(2):303-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.001.

Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y. Epigenetic regulation of adipogenesis by PHF2 histone demethylase. Diabetes. 2013 May;62(5):1426-34. doi: 10.2337/db12-0628.

Olguín HC, Pisconti A. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. J Cell Mol Med. 2012 May;16(5):1013-25. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01348.x.

Padilla-Benavides T, Nasipak BT, Imbalzano AN. Brg1 Controls the Expression of Pax7 to Promote Viability and Proliferation of Mouse Primary Myoblasts. J Cell Physiol. 2015 Dec;230(12):2990-7. doi: 10.1002/jcp.25031.

Pérez-Matute P, Martínez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Linoleic acid decreases leptin and adiponectin secretion from primary rat adipocytes in the presence of insulin. Lipids. 2007 Oct;42(10):913-20.

Peterbauer-Scherb A, van Griensven M, Meinl A, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration. J Tissue Eng Regen Med. 2010 Aug;4(6):485-90. doi: 10.1002/term.262.

Platt ID, El-Sohemy A. Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid. J Nutr Biochem. 2009 Dec;20(12):956-64. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.08.008.

Poulsen Ll, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. Semin Cell Dev Biol. 2012 Aug;23(6):631-9. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.003.

Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. Biochem J. 2002 Aug 1;365(Pt 3):561-75.

Ribet C, Montastier E, Valle C, Bezaire V, Mazzucotelli A, Mairal A, Viguerie N, Langin D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism

in human white adipocytes. Endocrinology. 2010 Jan;151(1):123-33. doi: 10.1210/en.2009-0726.

Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittinger M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res. 2002 Mar;307(3):321-7.

Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Loss of ovarian function in mice results in abrogated skeletal muscle PPARdelta and FoxO1-mediated gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 29;392(1):1-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.072.

Rogue A, Spire C, Brun M, Claude N, Guillouzo A. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. PPAR Res. 2010;2010:325183. doi: 10.1155/2010/325183.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes Dev. 2000 Jun 1;14(11):1293-307.

Rozwadowska N, Kolanowski T, Wiland E, Siatkowski M, Pawlak P, Malcher A, Mietkiewski T, Olszewska M, Kurpisz M. Characterisation of nuclear architectural alterations during in vitro differentiation of human stem cells of myogenic origin. PLoS One. 2013 Sep 3;8(9):e73231. doi: 10.1371/journal.pone.0073231. eCollection 2013.

Sakuma S, Nishioka Y, Imanishi R, Nishikawa K, Sakamoto H, Fujisawa J, Wada K, Kamisaki Y, Fujimoto Y. cis9, trans11-Conjugated Linoleic Acid Differentiates Mouse 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Small Adipocytes through Induction of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ. J Clin Biochem Nutr. 2010 Sep;47(2):167-73. doi: 10.3164/jcbn.10-44.

Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. PLoS One. 2009 Aug 4;4(8):e6498. doi: 10.1371/journal.pone.0006498.

Schuler M, Ali F, Chambon C, Duteil D, Bornert JM, Tardivel A, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. Cell Metab. 2006 Nov;4(5):407-14.

Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. Diabetes. 2005 Dec;54(12):3442-52.

Seok H, Cha BS. Refocusing Peroxisome Proliferator Activated Receptor-α: A New Insight for Therapeutic Roles in Diabetes. Diabetes Metab J. 2013 Oct;37(5):326-32. doi: 10.4093/dmj.2013.37.5.326.

Singh NK, Chae HS, Hwang IH, Yoo YM, Ahn CN, Lee SH, Lee HJ, Park HJ, Chung HY. Transdifferentiation of porcine satellite cells to adipoblasts with ciglitizone. J Anim Sci. 2007 May;85(5):1126-35.

Son C, Hosoda K, Matsuda J, Fujikura J, Yonemitsu S, Iwakura H, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Itoh H, Nishimura H, Inoue G, Yoshimasa Y, Yamori Y, Nakao K. Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes. Endocrinology. 2001 Oct;142(10):4189-94.

Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer. 2008 Jul 1;123(1):8-13. doi: 10.1002/ijc.23607.

Szczerbal I, Foster HA, Bridger JM. The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system. Chromosoma. 2009 Oct;118(5):647-63. doi:10.1007/s00412-009-0225-5.

Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. Nat Rev Rheumatol. 2009 Aug;5(8):442-7. doi:10.1038/nrrheum.2009.137.

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15924-9.

Tang L, Yin Y, Zhou H, Song G, Fan A, Tang B, Shi W, Li Z. Proliferative capacity and pluripotent characteristics of porcine adult stem cells derived from adipose tissue and bone marrow. Cell Reprogram. 2012 Aug;14(4):342-52. doi: 10.1089/cell.2011.0098.

Tang, Q.Q., T.C. Otto, M.D. Lane (2003) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 100: 850-855.

Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002 Jun;123(6):1132-40. PubMed PMID: 12063460.

Tsuzuki T, Ikeda I. Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat intestines, and similar absorption rates of 9c,11t-conjugated linoleic acid and 10t,12c-conjugated linoleic acid. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Aug;71(8):2034-40. Epub 2007 Aug 7. PubMed PMID: 17690459.

Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. J Cell Physiol. 2005 Nov;205(2):194-201.

Vejlsted M, Offenberg H, Thorup F, Maddox-Hyttel P. Confinement and clearance of OCT4 in the porcine embryo at stereomicroscopically defined stages around gastrulation. Mol Reprod Dev. 2006 Jun;73(6):709-18.

Wang D, Haile A, Jones LC. Rosiglitazone-induced adipogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line - biomed 2011. Biomed Sci Instrum. 2011;47:213-21.

Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. Nature. 2006 Nov 16;444(7117):364-8.

Wang YP, Zhou LS, Zhao YZ, Wang SW, Chen LL, Liu LX, Ling ZQ, Hu FJ, Sun YP, Zhang JY, Yang C, Yang Y, Xiong Y, Guan KL, Ye D. Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. EMBO J. 2014 Jun 17;33(12):1304-20. doi: 10.1002/embj.201387224.

Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. PLoS Biol. 2004 Oct;2(10):e294.

Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. Mol Cell Biol. 2012 Jun;32(12):2300-11. doi: 10.1128/MCB.06753-11.

Xie Q, Tian T, Chen Z, Deng S, Sun K, Xie J, Cai X. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Regenerative Medicine: Molecular Mechanism of PPAR in Adipocyte Differentiation of Stem Cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2015 Sep 1.

Xu C, Xu GH. [Adipose triglyceride lipase regulates adipocyte lipolysis]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2008 Jan;39(1):10-4.

Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med (Maywood). 2004 Jul;229(7):623-31.

Yanik SC, Baker AH, Mann KK, Schlezinger JJ. Organotins are potent activators of PPARγ and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. Toxicol Sci. 2011 Aug;122(2):476-88. doi: 10.1093/toxsci/kfr140.

Yu YH, Liu BH, Mersmann HJ, Ding ST. Porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces transdifferentiation of myocytes into adipocytes. J Anim Sci. 2006 Oct;84(10):2655-65.

Zhai JJ, Liu ZL, Li JM, Chen JP, Jiang L, Wang DM, Yuan J, Shen JG, Yang DP, Chen JQ. Different mechanisms of cis-9,trans-11- and trans-10,cis-12- conjugated linoleic acid affecting lipid metabolism in 3T3-L1 cells. J Nutr Biochem. 2010 Nov;21(11):1099-105. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.09.007.

Zhang Y, Chu Y, Shen W, Dou Z. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2009 Dec;9(6):943-6. doi: 10.1510/icvts.2009.211490.

Zhi-Bo Zhao, Yang L, Yuan Y. Computational determination of binding structures and free energies of glucose 6-phosphate dehydrogenase with novel steroid inhibitors. J Mol Graph Model 2014 Jun 2;51:168-72.

ANEXO 1

Artículos

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: 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-Serrano, Jesús J. Ramírez-Espinosa, Armando Shimada, Anaid Antaramian, Enrique Piña, Ofelia Mora

Agrociencia 46: 543-555. 2012.

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: 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-Serrano, Jesús J. Ramírez-Espinosa, Armando Shimada, Anaid Antaramian, Enrique Piña, Ofelia Mora.

Agrociencia 46: 543-555. 2012.

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: 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-Serrano**[1], Jesús J. **Ramírez-Espinosa**[1], Armando **Shimada**[2], Anaid **Antaramian**[3], Enrique **Piña**[4], Ofelia **Mora**[2*]

[1]Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. [2]Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. (ofemora66@unam.mx). [3]Instituto de Neurobiología, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. [4]Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, D. F. 0451, México.

Resumen

Las células troncales mesenquimales poseen características que las convierten en un modelo único para la investigación en el área biomédica. Su empleo como herramienta biotecnológica permite soluciones innovadoras a 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, radicando en ello su valor para la ingeniería y reparación de tejidos, tratamiento de enfermedades y manipulación de la diferenciación celular, e incluso la producción animal. El presente ensayo abarca aspectos básicos de su biología y caracterización en las especies domésticas, enfatizando la necesidad de homogenizar los criterios que permitirían caracterizar estas células en las especies pecuarias y sus posibles aplicaciones en salud y producción pecuaria.

Palabras clave: células troncales mesenquimales, médula ósea, caracterización, diferenciación celular, reparación de tejido, 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

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.
Recibido: septiembre, 2011. Aprobado: mayo, 2012.
Publicado como ENSAYO en Agrociencia 46: 371-382. 2012.

Abstract

Mesenchymal stem cells have characteristics that make them a unique model for research in the biomedical area. Its 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 multipotent 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 even 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, bone marrow, characterization, cell differentiation, tissue repair, multipotentiality.

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 favor the manipulation of cell differentiation in order to solve various problems in many areas, and here animal husbandry and veterinary clinic are emphasized.

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 aéreas, y aquí se enfatiza la clínica veterinaria y la zootecnia.

Biología

Las células troncales (CT) presentan la capacidad de pluripotencialidad o multipotencialidad al diferenciarse a linajes celulares diversos y proliferar en forma indiferenciada (Bianchi de Di Risio, 2004; Lindner *et al.*, 2010); por su origen las CT se clasifican en embrionarias (CTE) y somáticas (CTS). Las CTE 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.*, 2002). Las CTS son células multipotenciales (con capacidad de diferenciación limitada a algunos linajes celulares) provenientes de diversos tejidos y que, por su capacidad de autorrenovación, pueden ser cultivadas por largos periodos (Kuroda *et al.*, 2010).

Las CTS se han aislado de ratón, rata, perro, mono, cerdo, oveja, cabra, conejo, gato, pollo (Khatri *et al.*, 2009) y humano (Liechty *et al.*, 2000) y de diferentes tejidos: médula ósea (MO), tejido adiposo (Fraser *et al.*, 2008), cordón umbilical (Mendes *et al.*, 2005), músculo (Jiang *et al.*, 2002), placenta, sangre periférica (He *et al.*, 2007), músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, tejido pulmonar (Arévalo *et al.*, 2007), hígado fetal (Sarugaser *et al.*, 2009) riñón y páncreas (da Silva *et al.*, 2006), siendo los tres primeros tejidos los sitios de aislamiento más frecuentes. La utilización de CTS de tejidos específicos en aplicaciones como la terapia celular tiene como restricciones el éxito del aislamiento, la invasividad de la técnica y la cantidad y plasticidad de las células aisladas. La plasticidad de las CTS *in vivo* de los animales adultos se encuentra limitada, orientándose la capacidad de diferenciación hacia los linajes celulares de los tejidos donde residen. Se ha mostrado que, *in vitro*, las células comprometidas pueden ser reprogramadas y diferenciarse a más de un tipo celular (Håkelien *et al.*, 2002). La médula ósea es donde presentan menor compromiso, conservando la plasticidad que las caracteriza.

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

Biology

Stem cells (SC) have the pluripotent or multipotent capacity to differentiate into various cell lineages and proliferate in an undifferentiated form (Bianchi de Di Risio, 2004; Lindner *et al.*, 2010); for their origin SCs 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 into any cell lineage in the organism (Jiang *et al.*, 2002). 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 (Kuroda *et al.*, 2010).

The SSCs have been isolated from mouse, rat, dog, monkey, pig, sheep, goat, rabbit, cat, chicken (Khatri *et al.*, 2009), and human beings (Liechty *et al.*, 200) and from different tissues: bone marrow (BM), adipose tissue (Fraser *et al.*, 2008), umbilical cord (Mendes *et al.*, 2005), muscle (Jiang *et al.*, 2002), placenta, peripheral blood (He *et al.*, 2007), skeletal muscle, dermis, synovium, lung tissue (Arévalo *et al.*, 2007), fetal liver (Sarugaser *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 invasiveness of the technique, and the amount and plasticity of the isolated cells. The plasticity of the SSCs *in vivo* 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*, involved cells can be reprogrammed and differentiated into more than one cell type (Håkelien *et al.*, 2002). The bone marrow is where they have less 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 sinusoidal tissue located in the medullar cavity of long bones, sternum, hip bones and vertebrae fluffy; consists of endothelial, reticular cells, adipocytes, macrophages, fibroblastic cells, osteogenic progenitor cells, and somatic stem cells (Majumdar *et al.*, 1998). The main function of BM is to provide and mobilize SSC to

aspiración de la MO de la cresta ilíaca o la epífisis femoral y la selección de células mediante gradientes de densidad. La MO es un tejido sinusoidal localizado en la cavidad medular de los huesos largos, esternón, huesos de la cadera y vértebras esponjosas; está compuesta por células endoteliales, reticulares, adipocitos, macrófagos, fibroblastos, células precursoras osteogénicas y células troncales somáticas (Majumdar *et al.*, 1998). La función principal de la MO es proveer y movilizar CTS para reparar el tejido dañado en el organismo, por lo cual es el sitio con mayores reservas (Neuss *et al.*, 2004).

Las CTS de MO se clasifican en dos grupos: células hematopoyéticas (CH) y CT mesenquimales (CTM). Las CH presentan multipotencialidad hacia eritrocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, linfocitos y megacariocitos (Bianchi de Di Risio, 2004; Hombach-Klonisch *et al.*, 2008), constituyen sólo una pequeña porción de las células nucleadas aisladas, aproximadamente una célula por cada 10^4 a 10^8 células, y pueden aislarse de MO, sangre periférica y sangre del cordón umbilical (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008).

Las CTM presentan multipotencialidad hacia tejidos conjuntivos como hueso (Dong *et al.*, 2009), cartílago (Vidal *et al.*, 2006), adiposo, muscular (Zeng *et al.*, 2006) y neuronal, entre otros; son altamente proliferativas lo que permite mantener cultivos celulares durante largos periodos. Los cultivos *in vitro* constan de una población heterogénea (Bianco *et al.*, 2001) y morfológicamente presentan forma espigada (denominada fibroblastoide), con un núcleo grande, alargado y céntrico con dos o tres nucléolos (Flores-Figueroa *et al.*, 2006). En la Figura 1 se muestran las morfologias de las CTS de cuatro especies pecuarias obtenidas a partir de médula ósea y dermis, mostrando diferencias en el tamaño, forma y organización en el cultivo *in vitro*; sin embargo, conservan las caracteristicas morfológicas antes descritas.

Las funciones endógenas de las CTM en la reparación de tejido son poco claras. Sin embargo, se ha determinado que aumentan la proliferación y controlan la vasculogénésis mediante la secreción de citocinas y factores de crecimiento (interleucina 6 (IL-6), IL-11, factor inhibidor de leucemia y factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos) que permiten la regeneración del tejido dañado (Tuan *et al.*, 2003).

repair damaged tissue in the body, making it the site with the largest reserves (Neuss *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, neutrophils, basophils, lymphocytes, and megakaryocytes (Bianchi de Di Risio, 2004; Hombach-Klonisch *et al.*, 2008); they represent only a small portion of nucleated isolated cells, approximately one cell per 10^4 to 10^8 cells, and can be isolated from BM, peripheral blood, and umbilical cord blood (Hombach-Klonisch *et al.*, 2008).

MSCs have multipotentiality to conjunctive 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 (Bianco *et al.*, 2001) and, morphologically, they have a slender shape (referred to as fibroblastoid) with a large, elongated, and centric nucleus with two or three nucleoli (Flores-Figueroa *et al.*, 2006). Figure 1 shows the morphology of the SSCs of four livestock species obtained from bone marrow and dermis, showing differences in size, shape, and organization in the *in vitro* culture; 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-11, leukemia inhibitory factor, and stimulating factor of colonies of macrophages and granulocytes) which allow the regeneration of damaged tissue (Tuan *et al.*, 2003).

Characterization

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

Ability of adherence to plastic

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

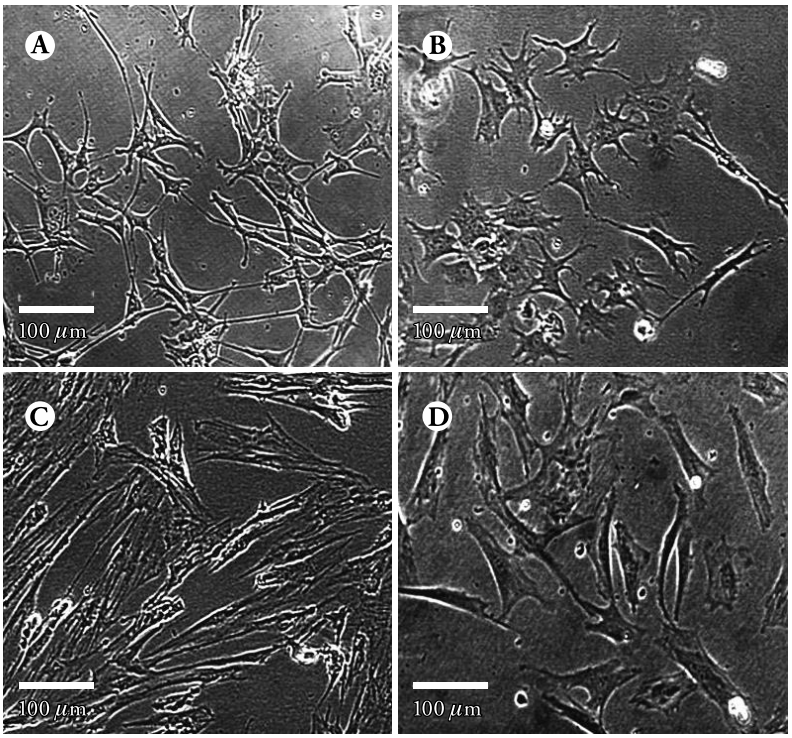


Figura 1. Morfología de las células troncales mesenquimales. CTS obtenidas de dermis de equino (A), médula ósea de pollo (B), cerdo (C) y bovino (D). (Microscopio de campo claro, aumento 100x).

Figure 1. Morphology of mesenchymal stem cells. SSCs obtained from equine dermis (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), señalan cinco criterios básicos para identificar una población celular como CTM.

Capacidad de adherencia al plástico

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

Capacidad proliferativa

Las CTM pueden cultivarse *in vitro* por periodos prolongados en estado indiferenciado y alcanzan un periodo de vida de entre 15 y 50 duplicaciones celulares (Grove *et al.*, 2004), por lo cual sólo pueden mantenerse durante un número limitado de subcultivos. Después ocurre una reducción progresiva de la proliferación, por lo que se les denomina Líneas Celulares Finitas (Freshney, 2006). Esta reducción en las CTM

their selection from the heterogeneous population of which they are isolated (including HC and reticular 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 15 to 50 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 (Freshney, 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 telomeres (Colleoni *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 reconstitute the cytoskeleton

es más temprana en contraste a las CTE donde la capacidad proliferativa está altamente conservada debido a un mecanismo de transcripción inversa endógena que les permite conservar sus telómeros (Colleoni *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a que no existen líneas celulares de CTE de especies pecuarias y las CTM poseen características similares, son un modelo útil de estudio para la investigación y desarrollo de tecnologías en el mejoramiento genético, clonación y reproducción.

Las CTM *in vitro* presentan un ciclo celular de tres periodos durante el cultivo: 1) Periodo de Retraso, dura 12 a 24 h, las células reconstituyen el citoesqueleto y secretan proteínas de matriz extracelular para adherirse al plástico; 2) Fase Exponencial donde la población celular se duplica, ocurriendo varias veces durante el cultivo; 3) Fase Estacionaria, momento idóneo 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.*, 2006) y en experimentos con CTM de bovinos y porcinos hubo 40 a 50 duplicaciones acumuladas después de 10 a 15 subcultivos (Colleoni *et al.*, 2005); 2) tiempo de duplicación celular que es el tiempo necesario para la duplicación de una célula y en CTM de equino es 4.9±1.6 d para células del primer subcultivo (Vidal *et al.*, 2006); 3) una curva de crecimiento celular acumulativa que muestra el comportamiento de las células a lo largo del cultivo respecto a su capacidad de proliferación.

En muestras de células aisladas de MO, la evaluación de estas tres características permite determinar la capacidad de autorrenovación, característica indispensable para ser consideradas como CTM. En varias investigaciones se reporta tiempos de duplicación celular para las CTM de algunas especies domésticas; sin embargo, no existen criterios uniformes sobre las características de proliferación siendo necesaria la investigación y la estandarización 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 grown in a given time (Vidal *et al.*, 2006) and in experiments with MSC of bovines and pigs there were 40 to 50 duplications accumulated after 10 to 15 subcultures (Colleoni *et al.*, 2005); 2) time of cell duplication which is the time required for duplication of a cell, and in horse 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 immuno-electron microscopy. The main limitation of these techniques is the lack of a specific molecule 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 ISTC 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 (Dominici *et al.*, 2006).

anticuerpos específicos como citometría de flujo, inmunocitoquímica (ICQ), western blot e inmunomicroscopía electrónica. La mayor limitante de esas técnicas 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 (aunque no exclusiva) en las CTM. Es importante tipificar la población aislada, para lo cual la ISCT publicó en el 2006 un listado que incluye anticuerpos para identificar las CTM y las CH (Cuadro 1).

Ese listado no identifica exclusivamente a las CTM, pero tomando en cuenta el origen y tipo de tejido aislado, se puede deducir su presencia (Dominici *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 estudiados más frecuentemente (rata, ratón 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 resolvería la controversia generada en investigaciones donde la falta de reactividad a los anticuerpos por las CTM puede deberse a que carecen de la expresión de tales marcadores o el anticuerpo usado no lo reconoce. Rozemuller *et al.* (2010) en un panel de 43 anticuerpos determinaron que reaccionan positivamente en varias especies, y reportaron los anticuerpos CD271, W8B2, W4A5, CD56, W3C4 (CD349), W5C4 y 58B1 con reacción positiva en mono, cabra, borrego, cerdo y perro.

Antibodies tested to determine the identity of MSCs from several species are used as models to study human clinical problems (Table 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 markers or the antibody used does not recognize it. Rozemuller *et al.* (2010), in a panel of 43 antibodies, determined that they react positively in several species and reported the antibodies CD271, W8B2, W4A5, CD56, W3C4 (CD349), W5C4, and 58B1 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 FoxD3; 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 (Oct 4) is present in the ESCs and in the MSCs. In tumor cells, the expression of Oct4 and Nanog has been determined confirming their high proliferative ability and viability for prolonged periods (Jeter *et al.*, 2009, Kong *et al.*, 2010). 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 (endoglina)	CD34 (Marcador primitivo de progenitoras hematopoyéticas y células endoteliales)
CD73 (Ecto´5 nucleotidasa)	CD45 (Marcador leucocitario)
CD90 (Thy-1)	CD14 y CD11b (Marcadores expresados en macrófagos y monocitos)

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

Molécula / Especie / Tejido	Mm[†] MO	Rn[¶] MO	Hx[§] MO	Hx[þ] UCB	Hx[¤] TA	Ss[††] MO	Ss[¶¶] Der	Fc[§§] MO	Fc[§§] TA	Cf[þþ] MO	Oa[¤¤] MO
Stro-1	NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	−
CD49b (VLA-a2)	NE	NE	−	NE	+	+	NE	NE	NE	NE	NE
CD29 (VLA-b)	+	+	+	+	+	+	+	NE	NE	NE	+
CD9	NE	NE	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CD73	+	NE	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CD90	NE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
CD105	+	NE	+	+/−	+	+	NE	+	+	+	−
CD146 (MUC-18)	NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CD44 (H-CAM)	+	NE	+	NE	+	+	NE	+	+	NE	+
CD34	NE	−	−	−	−	NE	NE	NE	NE	NE	−
CD31 (PECAM)	−	NE	−	NE	−	−	NE	NE	NE	NE	−
CD45	−	−	−	−	−	−	−	−	NE	−	−
CD14	−	NE	−	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	−
CD11b	−	−	−	NE	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE
CD166 (ALCAM)	NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	+
CD106 (VCAM-1)	−	+	−	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE

[†]Ratón (Gnecchi y Melo, 2009). [¶]Rata (Carvalho *et al.*, 2008). [§]Humano (Strem *et al.*, 2005; Halfon *et al.*, 2011; Karaöz *et al.*, 2011. [þ]Humano (Sarugaser *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2006). [¤]Humano (Kern *et al.*, 2006). [††]Cerdo (Zeng *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2007). [¶¶]Cerdo (Ock *et al.*, 2010). [§§]Gato (Quimby *et al.*, 2011). [þþ]Perro (Csaki *et al.*, 2007). [¤¤]Borrego (McCarty *et al.*, 2009). MO, médula ósea; UCB, sangre de cordón umbilical; TA, tejido adiposo; Der, dermis. + ICQ positiva, − ICQ negativa, NE no evaluado ❖ [†]Mouse (Gnecchi and Melo, 2009). [¶]Rat (Carvalho *et al.*, 2008). [§]Human (Strem *et al.*, 2005; Halfon *et al.*, 2011 ; Karaöz *et al.*, 2011). [þ]Human (Sarugaser *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2006). [¤]Human (Kern *et al.*, 2006). [††]Pig (Zeng *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2007). [¶¶]Pig (Ock *et al.*, 2010). [§§]Cat (Quimby *et al.*, 2011). [þþ]Dog (Csaki *et al.*, 2007). [¤¤]Sheep (McCarty *et al.*, 2009). MO, bone marrow; UCB, umbilical cord blood; TA, adipose tissue; Der, dermis. +ICQ positive, −ICQ negative, NE non evaluated.

Expresión de factores de transcripción

En las células de mamífero la multipotencialidad está bajo control de los factores de transcripción Oct4, Nanog, Sox2 y FoxD3; su expresión se modifica cuando la célula se compromete a un linaje celular específico iniciando la expresión de otros genes. La expresión de estos genes en las CTM es controversial porque son marcadores particulares de CTE.

Sin embargo, el factor de transcripción vinculante 4 (Oct 4) está presente en las CTE y en las CTM. En células tumorales se ha determinado la expresión de Oct4 y Nanog lo que confirma su alta capacidad proliferativa y viabilidad durante periodos prolongados (Jeter *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010). 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 (Violini *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 pigs, birds, and horses (Violini *et al.*, 2009), in the other domestic species, determination of these transcription factors has been limited to ESC. The identification of 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 regulating metabolism, tissue engineering, and cell differentiation.

Multipotentiality

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

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

	Cerdo[†] MO	Pollo[¶] MO	Humano[§Þ] MO	Humano[Þ] TA	Humano[Þ] dermis	Humano[Þ] corazón
Oct-4	+	+[¤]	+	+	+	+
Nanog	+	+	+	+	+	+
Sox2	+	+	+	+	+	+
FoxD3	NE	NE	+	NE	NE	NE
Rex-1	NE	NE	+	NE	NE	NE
SSEA-4	NE	NE	+	+	+	+

[†]Ock *et al.* (2010). [¶]Khatri *et al.* (2009). [§]Karaöz *et al.* (2011). [Þ]Riekstina *et al.* (2009). MO: médula ósea; TA: tejido adiposo. [¤]Nombrado PouV en pollos. + Expresión positiva reportada, NE no evaluado ❖ [†]Ock *et al.* (2010). [¶]Khatri *et al.* (2009). [§]Karaoz *et al.* (2011). [Þ]Riekstina *et al.* (2009). MO: bone marrow; TA: adipose tissue. [¤]Named PouV in chickens. + Reported positive expression, NE not evaluated.

factores en las CTS en las especies domésticas brindaría 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, inducidas mediante tecnologías de ADN recombinante, permitirá la generación de líneas celulares de CTS con una mayor capacidad de proliferación y diferenciación. Las líneas generadas de esta forma tendrían aplicaciones en el estudio de los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo, ingeniería de tejidos y diferenciación celular.

Multipotencialidad

Las CTM poseen la capacidad de diferenciarse a diversos tejidos, considerándose básica la capacidad adipogénica, osteogénica y condrogénica; pero no está limitada a estos linajes. Diversas investigaciones han logrado la diferenciación a cardiomiocitos (Akavia *et al.*, 2008), miocitos esqueléticos (Dezawa *et al.*, 2005; Akavia *et al.*, 2008) y lisos (Narita *et al.*, 2008), células endoteliales, hepatocitos (Zeng *et al.*, 2006), células β pancreáticas (Liu *et al.*, 2010), células gliales y neuronas (Shiota *et al.*, 2007; Bi *et al.*, 2010).

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

osteogenic, and chondrogenic capacity, but are not limited to these lineages. Various investigations have achieved the differentiation into cardiomyocytes (Akavia *et al.*, 2008), skeletal (Dezawa *et al.* 2005; Akavia *et al.*, 2008) and smooth (Narita *et al.*, 2008) myocytes, endothelial cells, hepatocytes (Zeng *et al.*, 2006), β-pancreatic cells (Liu *et al.*, 2010), glial cells, and neurons (Shiota *et al.*, 2007, Bi *et al.*, 2010).

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 serums or added), and some synthetic compounds.

In the differentiation of MSCs to osteocytes, fetal bovine serum, dexamethasone, β-glycerophosphate, and ascorbic acid are added to the culture medium; the differentiation to chondrocytes is induced by the transforming growth factors β1 and 3 (TGF-β1, TGF-β3), morphogenetic protein 4 (BMP4), insulin, transferrin, and sodium selenite (ITS); and the adipogenic differentiation uses dexamethasone, indomethacin, insulin, and isobutyl-methyl xanthine (IBMX) (Pittenger *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, immunochemical techniques [Western blot (WB), immunocytochemistry (ICC)], microscopy and electronic immunomicroscopy (MET, I-MET), and molecular biology [RT-PCR, PCR in real-time

En la diferenciación de CTM a osteocitos al medio de cultivo se agregan suero fetal bovino, dexametasona, β-glicerofosfato y ácido ascórbico; la diferenciación a condrocitos se induce con los factores de crecimiento transformante β1 y 3 (TGF-β1, TGF-β3), proteína morfogenética 4 (BMP4), insulina, transferrina y selenito de sodio (ITS); y la diferenciación adipogénica utiliza dexametasona, indometacina, insulina e isobutil-metil xantina (IBMX) (Pittenger *et al.*, 1999).

La evaluación de la capacidad de diferenciación de las CTM se lleva a cabo con técnicas de laboratorio e incluyen el uso de tinciones específicas para microscopía de campo claro (MCC), pruebas de actividad enzimática, técnicas inmunoquímicas [Western blot (WB), inmunocitoquímica (ICQ)] e inmunomicroscopía electrónica (MET, I-MET) y biología molecular [RT-PCR, PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR) y microarreglos de ADN] (Cuadro 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 (displasia de cadera y codo en perro), lesiones articulares (tendinitis y bursitis en caballos); mientras que en la zootecnia or quantitative (qPCR), and DNA microarrays] (Table 4).

The multipotentiality makes the MSCs in research models for cell therapy, tissue engineering, immunomodulation, 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 (tendinitis and bursitis 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 important to use different methods for their characterization. Within this characterization, the ability to adhere to plastic, proliferative capacity, and multipotency are well defined for mesenchymal stem cells, while expression of surface markers and transcription factors is controversial, 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. Techniques used in the analysis of cell differentiation of the MSCs and the characteristics found.

Linaje	Características encontradas	Técnica
Adipocitos	Detección de lípidos neutros Presencia de gotas lipídicas Expresión y síntesis de PPARγ adiponectina, LPL	MCC (tinción con rojo oleoso)[†] MET[§] PCR, qPCR, WB, ICQ[¶þ]
Condrocitos	Detección de proteoglicanos y colágena tipo II Expresión y síntesis de Sox9, aggrecan y colágena tipo II	MCC (tinción con azul alcián)[¤] I-MET[þ] PCR, qPCR, WB, ICQ[¤¶]
Osteocitos	Depósito de minerales en matriz extracelular Expresión y síntesis de osteocalcina y osteopontina.	MCC (tinción con rojo de alizarina o Von Kossa)[¶¶] PCR, qPCR, WB, ICQ[††]

[†]Khatri *et al.* (2009). [§]Eslaminejad *et al.* (2009). [¶]Bosnakovski *et al.* (2005). [þ]Zhang *et al.* (2012). [¤]Eslaminejad y Nadri (2009). [††]Mathews *et al.* (2012). [¶¶]Csaki *et al.* (2007).

el aprovechamiento de la multipotencialidad de las CTM para evaluar fármacos que modifiquen los procesos de diferenciación celular y metabólicos permitirá obtener sustancias que modifiquen las características de la carne.

Conclusiones

La validación de los resultados obtenidos en experimentos con células troncales mesenquimales es necesaria y es importante usar diferentes métodos para su caracterización. Dentro de esta caracterización, la capacidad de adherencia al plástico, la capacidad proliferativa y multipotencialidad están bien definidas para las células troncales mesenquimales, mientras que la expresión de marcadores de superficies y factores de transcripción es controversial, porque no se conoce un marcador específico y a dichos genes se consideran como marcadores de células troncales embrionarias.

Sin embargo, las propiedades de las células troncales mesenquimales las hacen un modelo idóneo para la investigación en zootecnia donde se pueden usar en estudios sobre calidad de carne y comportamiento productivo, así como en el área clínica para la regeneración e ingeniería de tejidos. Los puntos anteriores serán abarcados en la segunda parte del presente ensayo.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Proyecto PAPIIT IN200910 (UNAM, México). Este trabajo es parte de la tesis doctoral (UNAM) de los dos primeros autores, quienes contribuyeron de igual forma a su realización. Ambos agradecen al CONACYT la beca otorgada en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, México.

Literatura Citada

Akavia, U. D., O. Veinblat, and D. Benayahu. 2008. Comparing the transcriptional profile of mesenchymal cells to cardiac and skeletal muscle cells. J. Cell. Physiol. 216: 663-672.

Arévalo, A., D. Páez, y V. Rodríguez. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. Nova 5: 177-184.

Bi, Y., M. Gong, X. Zhang, X. Zhang, W. Jiang, Y. Zhang, J. Chen, Y. Liu, T. He, and T. Li. 2010. Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. Dev., Growth Differ. 52: 419-431.

Bianchi de Di Risio, C. C., F. Callero, A. Hidalgo, y P. Argibay. 2004. Células mesenquimales de médula ósea: diferenciación y potencial reemplazo neuronal. Medicina (Buenos Aires) 64: 543-549.

Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells 19: 180-192.

Bosnakovski, D., M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumura, and T. Fujinaga. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res. 319: 243-253.

Carvalho, A. B., L. F. Quintanilha, J. V. Dias, B. D. Paredes, E. G. Mannheimer, F. G. Carvalho, K. D. Asensi, B. Gutfilen, L. M. Fonseca, C. M. Resende, G. F. Rezende, C. M. Takiya, A. C. de Carvalho, and R. C. Goldenberg. 2008. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. Stem Cells 26: 1307-1314.

Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 25: 2739-2749.

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

Csaki, C., U. Matis, A. Mobasheri, H. Ye, and M. Shakibaei. 2007. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. Histochem. Cell Biol. 128: 507-520.

da Silva, M. L., P. C. Chagastelles, and N. B. Beyer. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J. Cell Sci. 119: 2204-2213.

Dezawa, M., H. Ishikawa, Y. Itokazu, T. Yoshihara, M. Hoshino, S. Takeda, C. Ide, and Y. Nabeshima. 2005. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. Science 309: 314-317.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 8: 315-317.

Dong, S. W., D. J. Ying, X. J. Duan, Z. Xie, Z. J. Yu, C. H. Zhu, B. Yang, and J. S. Sun. 2009. Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal

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

—End of the English version—

stem cells expressing Cbfa1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 2226-2233.

Eslaminejad, M. B., and S. Nadri. 2009. Murine mesenchymal stem cell isolated and expanded in low and high density culture system: surface antigen expression and osteogenic culture mineralization. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Anim. 45: 451-459.

Eslaminejad, M. B., H. Nazarian, F. Falahi, L. Taghiyar, and M. T. Daneshzadeh. 2009. Ex vivo expansion and differentiation of mesenchymal stem cells from goat bone marrow. Iran. J. Basic Med. Sci. 12: 70-79.

Flores-Figueroa, E., J. J. Montesinos, y H. Mayani. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. Rev. Invest. Clin. 58: 498-511.

Fraser, J. K., M. Zhu, I. Wulur, and Z. Alfonso. 2008. Adipose-derived stem cells. *In*: Prockop, D. J., D. G. Phinney, and B. A. Bunnell (eds). Mesenchymal Stem Cells, Methods and Protocols. Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp: 59-69.

Freshney, R. I. 2006. Basic principles of cell culture. *In*: Vunjak-Novakovic G., and R. I. Freshney (eds). Culture of Cells for Tissue Engineering. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Hobokan, New Jersey. pp: 3-21.

Gnecchi, M., and Melo L. 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. pp: 281-294.

Grove, J. E., E. Bruscia, and D. S. Krause. 2004. Plasticity of bone marrow–derived stem cells. Stem Cells 22: 487-500.

Halfon, S., N. Abramov, B. Grinblat, and I. Ginis. 2011. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. Stem Cells Dev. 20: 53-66.

Hakelien, A. M., H. B. Landsverk, J. M. Robl, B. S. Skålhegg, and P. Collas. 2002. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. Nat Biotechnol. 20(5): 460-466.

He, Q., C. Wan, and G. Li. 2007. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. Stem Cells 25: 69-77.

Hombach-Klonisch, S., S. Panigrahi, I. Rashedi, A. Seifert, E. Alberti, P. Pocar, M. Kurpisz, K. Schulze-Osthoff, A. Mackiewicz, and M. Los. 2008. Adult stem cells and their trans-differentiation potential —perspectives and therapeutic applications. J. Mol. Med. (Berl) 86: 1301-1314.

Jeter, C. R., M. Badeaux, G. Choy, D. Chandra, L. Patrawala, C. Liu, T. Calhoun-Davis, H. Zaehres, G. Q. Daley, and D. G. Tang. 2009. Functional evidence that the self-renewal gene nanog regulates human tumor development. Stem Cells 27: 993-1005.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, and C. M. Verfaillie. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418: 41-49.

Karaöz, E., A. Okçu, G. Gacar, O. Sağlam, S. Yürüker, and 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.

Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 24: 1294-1301.

Khatri, M., T. D. O'Brien, J., and M. Sharma. 2009. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. Stem Cells Dev. 18: 1485-1494.

Kong, D., S. Banerjee, A. Ahmad, Y. Li, Z. Wang, S. Sethi, and F. H. Sarkar. 2010. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. PLoS One 5: e12445.

Kumar, B. M., H. F. Jin, J. G. Kim, S. A. Ock, Y. Hong, S. Balasubramanian, S. Y. Choe, and G. J. Rho. 2007. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. Dev. Dyn. 236: 435-446.

Kuroda, Y., M. Kitada, S. Wakao, K. Nishikawa, Y. Tanimura, H. Makinoshima, M. Goda , H. Akashi, A. Inutsuka, A. Niwa, T. Shigemoto, Y. Nabeshima, T. Nakahata, Y. Nabeshima, Y. Fujiyoshi, and M. Dezawa. 2010. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 107: 8639-8643.

Lee, S. L., E. J. Kang, G. H. Maeng, M. J. Kim, J. K. Park, T. S. Kim, S. H. Hyun, E. S. Lee, and G. J. Rho. 2010. Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells. J. Reprod. Dev. 56: 256-262.

Liechty, K., T. Mackenzie, A. Shaaban, A. Radu, A. M. Moseley, R. Deans, D. R. Marshak, and A. W. Flake. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. Nat. Med. 6: 1282-1287.

Lindner, U., J. Kramer, J. Rohwedel, and P. Schlenke. 2010. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? Transfus. Med. Hemother. 37: 75-83.

Liu, G. L., Y. F. Lu, W. J. Li, H. Z. Xiao, G. G. Sun, F. Yu, X. X. Xiang, H. Q. Zhang, X. L. Liu, Y. P. Shi, and S. Li. 2010. Differentiation of marrow-derived islet-like cells and their effects on diabetic rats. Chin. Med. J. (Engl) 123: 3347-3350.

Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman, and S. L. Gerson. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (mcss) and stromal cells. J. Cell. Physiol. 176: 57-66.

Mathews, S., S. A. Mathew, P. K. Gupta, R. Bhonde, and S. Totey. 2012. Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. J Tissue Eng. Regen. Med. (6)5: 369-377.

Mendes, S. C., Robin, C. Dzierzak, E. 2005. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny, Development 132: 1127-1136.

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

Narita, Y., A. Yamawaki, H. Kagami, M. Ueda, and Y Ueda. 2008. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. Cell Tissue Res. 333: 449-459.

Neuss, S., E. Becher, M. Wöltje, L. Tietze, and W. Jahnen-Dechent. 2004. Functional expression of HGF and HGF Receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. Stem Cells 22: 405-414.

Ock, S. A., B. G. Jeon, and G. J. Rho. 2010. Comparative characterization of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow extract and skin tissues. Tissue Eng. Part C Methods 16: 1481-1491.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshkar. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147.

Quimby, J. M., T. L. Webb, D. S. Gibbons, and S. W. Dow. 2011. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. J. Feline Med. Surg. 13: 418-426.

Riekstina, U., I. Cakstina, V. Parfejevs, M. Hoogduijn, G. Jankovskis, I. Muiznieks, R. Muceniece, and J. Ancans. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. Stem Cell Rev. 5: 378-386.

Rozemuller, H., H. J. Prins, B. Naaijkens, J. Staal, H. J. Bühring, and A. C. Martens. 2010. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies. Stem Cells Dev. 19: 1911-1921.

Sarugaser, R., L. Hanoun, A. Keating, W. L. Stanford, and J. E. Davies. 2009. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. PLoS One 4: e6498.

Shiota, M., T. Heike, M. Haruyama, S. Baba, A. Tsuchiya, H. Fujino, H. Kobayashi, T. Kato, K. Umeda, M. Yoshimoto, and T. Nakahata. 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. Exp. Cell Res. 313: 1008-1023.

Strem, B. M., K. C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. E. Schreiber, J. K. Fraser, and M. H. Hedrick. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J. Med. 54: 132-141.

Tuan, R., G. Boland, and R. Tuli. 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res. Ther. 5: 32-45.

Vidal, M. A., G. E. Kilroy, J. R. Johnson, M. J. Lopez, R. M. Moore, and J. M. Gimble. 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.

Violini, S., P. Ramelli, L. F. Pisani, C. Gorni, and P. Mariani P. 2009. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12. BMC Cell Biol. 10: 29.

Zhang, Y., D. Khan, J. Delling, and E. Tobiasch. 2012. Mechanisms underlying the osteo-and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. Scientific World Journal. doi: 10.1100/2012/793823.

Zeng, L., E. Rahrmann, Q. Hu, T. Lund, L. Sandquist, 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.

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES: 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-Serrano**[1], Jesús J. **Ramírez-Espinosa**[1], Armando **Shimada**[2], Anaid **Antaramian**[3], Enrique **Piña**[4], Ofelia **Mora**[2,1*]

[1]Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. [2]Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. (ofemora66@unam.mx). [3]Instituto de Neurobiología, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. [4]Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior, Ciudad Universitaria, 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 idóneo en el estudio y desarrollo de herramientas biotecnológicas 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 ingeniería 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 tisular de las especies domésticas.

Palabras clave: células troncales mesenquimales, médula ósea, diferenciación celular, multipotencialidad, producción animal, terapia celular.

Introducción

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

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.
Recibido: septiembre, 2011. Aprobado: julio, 2012.
Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 46: 543-555. 2012.

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 biotechnological 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 of endangered species and better understanding of the processes of tissue 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 using rats and mice, or even humans, as models. 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

Cuadro 1. Células troncales mesenquimales (CTM) de médula ósea (MO) de especies domésticas como modelo biológico.
Table 1. Mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow of domestic species as biological model.

Especie	Modelo	Referencia
Felino	Enfermedad renal crónica	Quimby, 2011
Caprino	Ingeniería de tejidos y regeneración de cartílago	Quintavalla, 2002; Liu, 2010
Ovino	Ingeniería de tejidos y regeneración de cartílago	Rhodes, 2004; Vincentelli, 2007
	Regeneración de válvulas cardiacas	Vincentelli, 2007
Porcino	Infarto de miocardio	Shake, 2002; Huang, 2006
	Regeneración tisular	Plánka, 2009
Bovino	Transferencia nuclear	Kato, 2004; Colleoni, 2005
	Ingeniería de tejidos y regeneración de cartílago	Bosnakovski, 2005; Zhu, 2008
Canino	Regeneración tisular	Eslaminejad, 2008; Li, 2009
	Tratamiento de lesión espinal	Jung, 2009
	Inmunomodulación	Kim, 2010
	Infarto de miocardio	Silva, 2005
Ave	Inmunomodulación	Khatri, 2009
	Transgénesis	Heo, 2011

células a adipocitos y osteocitos. Quimby *et al.* (2011) reportan resultados similares con esta especie para la diferenciación a adipocitos y osteocitos, y también a condrocitos.

Equinos

En equinos, Vidal *et al.* (2006) determinaron la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTM y el tiempo de duplicación celular fue 1.4±0.26 d, alcanzando 30±2.4 duplicaciones celulares para el décimo pasaje. Asimismo, se diferenciaron las CTM aisladas a los linajes adiposo y óseo.

Porcinos

Las células mesenquimales de MO de los porcinos incrementan su número a un ritmo regular hasta el décimo pasaje y en los pasajes subsecuentes disminuye hasta el décimo quinto pasaje, cuando el crecimiento celular se detiene, alcanzando alrededor de 40 duplicaciones (Colleoni *et al.*, 2005). Las células aisladas mostraron capacidad de diferenciación adiposa y ósea, mientras que cultivos tratados con 5' azacitidina, además de presentar acúmulo de gotas lipídicas formaban multicapas en el cultivo y algunas células presentaron vacuolas en su citoplasma, las cuales indican diferenciación adiposa en estas células. Otras tratadas con el mismo reactivo se observaron bi o multinucleadas, además de expresar el gen para

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

Pigs

Bone marrow mesenchymal cells of pigs increase in number at a regular rhythm until the tenth passage and decrease in subsequent passages until the fifteenth passage when cell growth ceases, achieving around 40 duplications (Colleoni *et al.*, 2005). The isolated cells exhibited the ability to differentiate into adipocytes and osteocytes, while cultured cells treated with 5'azacitidin, 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 reactant were observed to be bi- or multi-nucleated, as well as expressing the gene for the myosin heavy chain, a marker for muscle differentiation (Collenoi *et al.*, 2005).

The MSC from pre- and postnatal bone marrow samples possess the ability to proliferate above 30 cell duplications (Zeng *et al.*, 2008). An important finding was that some of the isolated clones from prenatal samples expressed Oct3/4, a highly important transcription factor in maintaining cell pluripotency during the embryo stage (Abu-Remaileh *et al.*, 2010); this expression remains stable even after 90 cell duplications. The cells isolated by

condrogénica y adipogénica, además de características morfológicas particulares de estos linajes. Los cultivos diferenciados a osteocitos tenían una morfología cuboidal, las células tratadas con medio condrogénico mostraron morfología redondeada y un aumento en la densidad celular con formación de multicapas, y las células diferenciaciadas a adipocitos tenían vacuolas lipídicas.

Aves

Los estudios son escasos y centrados principalmente en pollos. Khatri *et al.* (2009) caracterizaron CTM aisladas de MO de pollo y mediante PCR encontraron la expresión de los marcadores de superficie CD44, CD90, CD105 y de los factores de transcripción PouV (homólogo a Oct4 de mamíferos), Sox2 y Nanog que controlan el desarrollo y diferenciación de las CTM. Estos investigadores indujeron la diferenciación a los linajes adiposo, cartilaginoso y óseo.

Estos estudios muestran la caracterización parcial de las CTM de MO de diferentes especies. En este sentido, 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 identidad y 3) potencial de diferenciación a adipocitos, osteocitos y condrocitos (Dominici *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 roedores (rata y ratón) y humano. Sin embargo, respecto a la expresión de marcadores los datos obtenidos de especies pecuarias son inconclusos. La ISCT sugiere que las CTM deben expresar por lo menos los marcadores CD105, CD90 y CD73, pero en especies pecuarias sólo se reportan algunos de estos marcadores y otros más asociados a las CTM.

En contraste, Rozemuller *et al.* (2010) con un panel de 43 anticuerpos probados en mono, caprinos, ovinos, porcinos y caninos determinaron que todos ellos reaccionan positivamente a los anticuerpos CD271, W8B2, W4A5, CD56, W3C4 (CD349), W5C4 y 58B1, pero McCarty *et al.* (2009) no encontraron expresión de CD90 y CD105 en ovinos. En estos experimentos se usaron anticuerpos diseñados para reaccionar a los antígenos de humanos o roedores, lo cual puede explicar la falta de reactividad en otras especies. Es necesario diseñar anticuerpos específicos para cada

of surface markers CD44, CD90, CD105, and the transcription factors PouV (homologous to the mammal Oct4), Sox2 and Nanog, which control the development and differentiation of MSC. These researchers induced differentiation to adipose, cartilage and bone lineages.

These 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 for differentiation into adipocytes, osteocytes and chondrocytes (Dominici *et al.*, 2006).

Regarding the capacity to adhere and potential to differentiate, all of the domestic species studied share these characteristics with rodent (rats 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 CD105, 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, Rozemuller *et al.* (2010), with a panel of 43 antibodies tested in monkeys, goats, sheep, pigs and dogs, determined that all these species reacted positively to the antibodies CD271, W8B2, W4A5 (CD349), W5C4, and 58B1, 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 (Oct3/4, Nanog or Sox2) indicates multipotency in isolated cells and is a characteristic that should be determined in these species since it would allow better identification of bone marrow MSC. This has been accomplished in poultry (Khatri *et al.*, 2009) and horses (Violini *et al.*, 2009), but it is still pending in other domestic species.

Bone marrow MSC applications in veterinary medicine and animal production

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

la cadena pesada de miosina, un marcador de la diferenciación muscular (Colleoni *et al.*, 2005).

Las CTM de muestras de MO pre y posnatales poseen una capacidad de proliferación superior a las 30 duplicaciones celulares (Zeng *et al.*, 2006). Un hallazgo importante fue que algunas de las clonas aisladas de muestras prenatales expresan Oct3/4, un factor de transcripción de gran importancia en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células durante la etapa embrionaria (Abu-Remaileh *et al.*, 2010), y dicha expresión se mantiene estable aún después de 90 duplicaciones celulares en estas clonas. Las células aisladas por Zeng *et al.* (2006) mostraron capacidad de diferenciarse a una amplia gama de linajes celulares: adipocitos, condrocitos, osteocitos, células musculares lisas, células endoteliales, hepatocitos y células del neuroectodermo.

Ovinos y caprinos

En caprinos, Quintavalla *et al.* (2002) observaron la capacidad de diferenciación condrogénica y osteogénica de células de la MO. Además, Eslaminejad *et al.* (2007, 2009) evaluaron la capacidad de proliferación y diferenciación de las CTM de MO de ovinos y caprinos. Ellos encontraron que las células aisladas de ambas especies tienen capacidad osteogénica, adipogénica y condrogénica, mientras que el tiempo de duplicación celular fue 24.94±2.67 h para caprinos y 24.9 h para ovinos.

Según McCarty *et al.* (2009), la abundancia de CTM con muestras obtenidas de ovinos adultos fue 4.6±0.7 células por cada 1×10^5 células mononucleares, que expresan los marcadores de CTM: CD44, CD166 y CD29 y poseen capacidad osteogénica, condrogénica y adipogénica y carecen de la expresión de los marcadores Stro-1, CD146, CD90, y CD105 de CTM, y CD14, CD31 y CD45 de CH.

Bovinos

En bovinos, Colleoni *et al.* (2005) determinaron que las células aisladas se pueden duplicar 50 veces. Las CTM aisladas tenían capacidad osteogénica, mientras que cultivos tratados con 5' azacitidina mostraron capacidad adipogénica (presencia de gotas lipídicas) y miogénica (expresión de cadena pesada de miosina). Según Bosnakovski *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, Quintavalla *et al.* (2002) observed the ability of bone marrow cells for chondrogenic and osteogenic differentiation. Also, Eslaminejad *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 24.94±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 1×10^5 mononuclear cells. These cells express the MSC markers CD44, CD166 and CD29 and have osteogenic, chondrogenic and adipogenic capacity; they lack expression of the MSC markers Stro-1, CD146, CD90, and CD105, and HC markers CD14, CD31, and CD45.

Bovines

In bovines, Colleoni *et al.* (2005) determined that isolated cells can duplicate 50 times. Isolated MSC had osteogenic capacity, while cultured cells treated with 5' azacitidin exhibited adipogenic (presence of lipid drops) and myogenic (expression of the heavy myosin chain) capacity. According to Bosnakovski *et al.* (2005), bovine MSC have osteogenic, chondrogenic, and adipogenic capacity as well as morphological characteristics particular to these lineages. The cultured cells differentiated into osteocytes had cuboidal morophology; 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 are scarce and focused mainly on broilers. Khatri *et al.* (2009) characterized MSC isolated from bone marrow and, using PCR, found the expression

condrogénica y adipogénica, además de características morfológicas particulares de estos linajes. Los cultivos diferenciados a osteocitos tenían una morfología cuboidal, las células tratadas con medio condrogénico mostraron morfología redondeada y un aumento en la densidad celular con formación de multicapas, y las células diferenciaciadas a adipocitos tenían vacuolas lipídicas.

Aves

Los estudios son escasos y centrados principalmente en pollos. Khatri *et al.* (2009) caracterizaron CTM aisladas de MO de pollo y mediante PCR encontraron la expresión de los marcadores de superficie CD44, CD90, CD105 y de los factores de transcripción PouV (homólogo a Oct4 de mamíferos), Sox2 y Nanog que controlan el desarrollo y diferenciación de las CTM. Estos investigadores indujeron la diferenciación a los linajes adiposo, cartilaginoso y óseo.

Estos estudios muestran la caracterización parcial de las CTM de MO de diferentes especies. En este sentido, 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 identidad y 3) potencial de diferenciación a adipocitos, osteocitos y condrocitos (Dominici *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 roedores (rata y ratón) y humano. Sin embargo, respecto a la expresión de marcadores los datos obtenidos de especies pecuarias son inconclusos. La ISCT sugiere que las CTM deben expresar por lo menos los marcadores CD105, CD90 y CD73, pero en especies pecuarias sólo se reportan algunos de estos marcadores y otros más asociados a las CTM.

En contraste, Rozemuller *et al.* (2010) con un panel de 43 anticuerpos probados en mono, caprinos, ovinos, porcinos y caninos determinaron que todos ellos reaccionan positivamente a los anticuerpos CD271, W8B2, W4A5, CD56, W3C4 (CD349), W5C4 y 58B1, pero McCarty *et al.* (2009) no encontraron expresión de CD90 y CD105 en ovinos. En estos experimentos se usaron anticuerpos diseñados para reaccionar a los antígenos de humanos o roedores, lo cual puede explicar la falta de reactividad en otras especies. Es necesario diseñar anticuerpos específicos para cada

of surface markers CD44, CD90, CD105, and the transcription factors PouV (homologous to the mammal Oct4), Sox2 and Nanog, which control the development and differentiation of MSC. These researchers induced differentiation to adipose, cartilage and bone lineages.

These 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 for differentiation into adipocytes, osteocytes and chondrocytes (Dominici *et al.*, 2006).

Regarding the capacity to adhere and potential to differentiate, all of the domestic species studied share these characteristics with rodent (rats 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 CD105, 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, Rozemuller *et al.* (2010), with a panel of 43 antibodies tested in monkeys, goats, sheep, pigs and dogs, determined that all these species reacted positively to the antibodies CD271, W8B2, W4A5 (CD349), W5C4, and 58B1, 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 (Oct3/4, Nanog or Sox2) indicates multipotency in isolated cells and is a characteristic that should be determined in these species since it would allow better identification of bone marrow MSC. This has been accomplished in poultry (Khatri *et al.*, 2009) and horses (Violini *et al.*, 2009), but it is still pending in other domestic species.

Bone marrow MSC applications in veterinary medicine and animal production

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

especie, así como una caracterización más completa de la expresión de diferentes 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 identificacón de las CTM de MO. Esto se ha determinado en aves (Khatri *et al.*, 2009) y equinos (Violini *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 crónico degenerativas, la generación de animales más eficientes o resistentes a enfermedades, una mayor comprensión del desarrollo y diferenciación de los tejidos muscular y adiposo, así como la conservación y preservación de especies silvestres y razas de especies domésticas en peligro de extinción.

Terapéutica

Las principales aplicaciones de estas células en el área veterinaria son el tratamiento de lesiones del aparato locomotor, en particular en los tejidos óseo, cartilaginoso y tendinoso en equinos y caninos. En los equinos las CTM de MO se usan para el tratamiento de lesiones ocasionadas por carreras o saltos: tendinopatias, lesiones en ligamentos, fracturas, laminitis y enfermedades articulares (Smith *et al.*, 2003; Borjesson y Peroni, 2011). *In vitro* se ha comprobado su capacidad de diferenciarse a los linajes óseo, cartilaginoso, adiposo y tendinoso (Violini *et al.*, 2009; Lettry *et al.*, 2010). *In vivo* se utilizan en modelos experimentales de tendinitis (Crovace *et al.*, 2010) y en estudios clínicos los resultados son favorables; Smith (2008) reporta reincidencia de 18 % en lesiones del tendón flexor digital superficial después de un año de seguimiento (n=168), comparado con 56 % de reincidencia para animales que siguieron el programa de rehabilitación común para este tipo de lesiones.

and differentiate opens up possibilities for treatment of traumatism 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 lesions to the locomotor system, particularly bone, cartilage and tendon tissue in horses and dogs. In horses, bone marrow MSC are used in the treatment of lesions caused during races or jumping: tendinopathies, ligament lesions, fractures, laminitis and articular diseases (Smith *et al.*, 2003; Borjesson and Peroni, 2011). *In vitro*, their capacity to differentiate into bone, cartilage, adipose and tendon lineages has been demonstrated (Violini *et al.*, 2009; Lettry *et al.*, 2010). These cells are used *in vivo* in experimental models of tendinitis (Crovace *et al.*, 2010) and in clinical studies results are favorable; Smith (2008) report an 18 % reincidence in lesions of the superficial digital flexor tendon after one year of follow-up (n=168), compared with 56 % reincidence 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 adipose tissue in clinical cases of osteoarthritis in elbow and coxofemoral articulation (Black *et al.*, 2007, 2008). In the first study, 14 dogs of different breeds were treated with MSC from adipose tissue applied to the elbow. The six month follow-up of the evolution of their lameness showed an improvement of 34±4.7%.

Besides these therapeutic applications with mesenchymal cells, and given that pets suffer diseases similar to those of humans, their use in treatment of diabetes, cardiomyopathies (Minguell *et al.*, 2010), lesions in the spinal cord (Olby, 2010), immunological diseases, skin and mucusal lesions (El-Menoufy *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2010) and chronic renal disease (Quimby *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 MO 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 seguimiento de seis meses de la evolución de la discapacidad para desplazarse mostró una mejora de 34 ± 4.7 %.

Además de estas aplicaciones de la terapia con células mesenquimales y dado que los animales de compañía padecen enfermedades similares a las del ser humano, se investiga su uso en diabetes, cardiomiopatías (Minguell *et al.*, 2010), lesiones en médula espinal (Olby, 2010), enfermedades inmunológicas, lesiones en piel y mucosas (El-Menoufy *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2010) y enfermedad renal crónica (Quimby *et al.*, 2011). Las investigaciones sobre el uso terapeútico de las CTM en animales de compañía y equinos es escasa pero sus 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

Hoy se conocen los mecanismos básicos del desarrollo de ambos tejidos en modelos murinos y humanos (Buckingham *et al.*, 2003; Chargé y Rudnicki, 2004; Rosen y MacDougald, 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 (Hausman *et al.*, 2009; Dodson *et al.*, 2010) o bien al desarrollo y expresión génica de estos tejidos durante el periodo fetal (Davoli *et al.*, 2011) y posnatal (Ropka-Molik *et al.*, 2011).

El estudio *in vitro* de la capacidad de diferenciación de CTM provenientes de especies pecuarias hacia células musculares y adiposas permitirá conocer los mecanismos y factores implicados en el desarrollo de estos tejidos, usando como modelo células 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

Today, the basic mechanism of development of these two tissues in murine and human models is known (Buckingham *et al.*, 2003; Charge and Rudnicki, 2004; Rosen and MacDougald, 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 (Hausman *et al.*, 2009; Dodson *et al.*, 2010) or on the development and gene expression of these tissues during the fetal (Davoli *et al.*, 2011) and postnatal (Ropka-Molik *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 pre-adipocytes.

Knowledge of the events that lead to differentiation into muscle or adipose in MSC will support the development of techniques and compounds to manipulate differentiation into these tissues from early development stages or to stimulate differentiation of quiescent 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 fibrates and thiazolidinediones (Nakano *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009) that can modify metabolism and gene expression of these tissues and, therefore, productive response.

Reproduction, nuclear transfer, recombinant DNA technologies and transgenesis

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

El conocimiento de los eventos que conducen a la diferenciación muscular o adiposa en las CTM permitirá desarrollar técnicas y compuestos para manipular la diferenciación de estos tejidos desde etapas tempranas del desarrollo, o estimular la diferenciación de células quiescentes presentes en los tejidos. El uso de las CTM como modelo de adipogénesis y miogénesis permitirá la evaluación de componentes no nutricionales (fitoquímicos) de las dietas de los animales y de sustancias sintéticas, como los fibratos y las tiazolidinedionas (Nakano *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009) que puedan modificar el metabolismo y expresión génica de estos tejidos y por tanto la respuesta productiva.

Reproducción, transferencia nuclear, tecnologías de ADN recombinante y transgénesis

La transferencia nuclear (remoción del núcleo de un ovocito y su sustitución por el núcleo de una célula somática) es una técnica que requiere una fuente de células donantes, una fuente de ovocitos adecuada y hembras receptoras para llevar a cabo la gestación (Tecirlioglu *et al.*, 2006). Esta técnica se puede usar para preservar especies en peligro de extinción como el lobo (Oh *et al.*, 2008) o el borrego cimarrón (Williams *et al.*, 2006). En las especies domésticas puede utilizar para clonar animales genéticamente superiores, rescatar razas con poblaciones escasas (Jang *et al.*, 2009) y mascotas (Vanderwall *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2011).

Las técnicas de ADN recombinante y transgénesis permiten introducir genes foráneos al genoma del organismo, y resulta en la expresión de caracteres deseados como resistencia a enfermedades, síntesis de productos farmacéuticos o la sobreexpresión de genes que modifiquen positivamente la producción (mejor conversión alimenticia, rápido crecimiento, producción de proteínas específicas en la leche) (Ahmed y Khosa, 2010).

La utilización de las CTM en las técnicas de transferencia nuclear, aprovechando sus características de proliferación y su estado indiferenciado, permitiría obtener una gran cantidad de células donadoras de núcleo para transferencia; mientras que su uso en técnicas de ADN recombinante y transgénesis permitiría emplearlo en técnicas de transferencia nuclear para generar animales transgénicos. Por ejemplo, pollos transgénicos que expresan proteína *et al.*, 2006). This technique can be used to preserve endangered species such as the wolf (Oh *et al.*, 2008) or mountain sheep (Williams *et al.*, 2006). In domestic species, it can be used to clone genetically superior animals or to rescue breeds with small populations (Jang *et al.*, 2009) and pets (Vanderwall *et al.*, 2006; Oh *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 over-expression of genes that modify production positively (better feed conversion, fast growth, production of specific proteins in milk) (Ahmed 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 it in techniques of nuclear transference in order to generate transgenic animals. An example is transgenic broilers that express Green Fluorescent Protein (eGFP) obtained from crossing parents that received, directly in the testicles, bone marrow MSC transfected with eGFP that differentiated into germinal cells capable of producing spermatozoa. Later, with semen obtained from these animals, normal hens were artificially inseminated; from this cross, three eGFP chicks of a total of 309 were obtained from four roosters with eGFP semen (Heo *et al.*, 2011). Even though production efficiency of this type of animals 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: spread of diseases, environmental pollution, human competition for food and production efficiency, as well as to improve animal well-being (Langelaan *et al.*, 2010). The development of this technology will allow the production of meat designed with a specific composition for the needs

verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, eGFP) a partir de la cruza de padres a los que se transplantaron directamente a los testículos CTM de MO transfectadas con eGFP y que se diferenciaron a células germinales capaces de producir espermatozoides. Después, con semen obtenido de estos animales se inseminó artificialmente a gallinas normales y de estas cruzas se obtuvieron tres aves eGFP, de un total de 309, a partir de cuatro machos con semen eGFP (Heo *et al.*, 2011). La eficiencia para producir este tipo de animales es baja, pero ya hay medios para generarlos. El perfeccionamiento de las técnicas necesarias (uso de CTM como células donadoras), permitirá en un futuro cercano su uso para generar animales con características deseables.

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: bienestar animal, diseminación de enfermedades, contaminación ambiental, competencia por alimentos con el hombre y eficiencia de la producción (Langelaan *et al.*, 2010). El desarrollo de esta tecnología permitirá la producción de carne diseñada con una composición especifica para las necesidades y preferencias del consumidor (mediante tecnología de ADN recombinante y transgénesis), disminuir el número de animales, el tiempo de producción y el riesgo de enfermedades de origen alimentario; además, producir esta carne en espacios menores a los utilizados por la producción industrial de animales (Bhat y Fayaz, 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 utilizadas (Mironov *et al.*, 2009; Langelaan *et al.*, 2010).

El modelo ideal para esta tecnología son las células troncales embrionarias (CTE); sin embargo, las únicas 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, Brevini *et al.* (2010) reportan la obtención de líneas de CTE en cerdos. Además, el uso de células troncales pluripotenciales inducidas (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC) es otra alternativa, pero la generación de estas células

and preferences of the consumer (using recombinant DNA and transgenetic technologies), 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 (Bhat and Fayaz, 2011). But the methods and technologies required for implementation are still in process of development, such as to obtain cells 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; Langelaan *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, Brevini *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 requires the transfection of the transcription factors Oct4, Sox-2 and those factors related to tumors Klf4 and c-Myc (Takahashi, 2006) to recover pluripotency. Transfection with these factors is done one at a time, and thus the technique is risky and slow. Because of this, for studies in this new technology, satellite cells from muscle tissue are used; these have the drawback of a reduced number of cell duplications (Langelaan *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

desde células somáticas requiere la transfección de los factores de transcripción Oct4, Sox-2 y de los factores relacionados a tumores Klf4 y c-Myc (Takahashi, 2006) para recuperar la pluripotencialidad. La transfección con estos factores se realiza uno a la vez, por lo cual la técnica es riesgosa y lenta. Por ello, para los estudios de esta nueva tecnología se usan células satélite provenientes del tejido muscular, cuya desventaja es un número reducido de duplicaciones celulares (Langelaan *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 satélite usadas ahora, así como la capacidad de diferenciación para dar origen a diferentes linajes 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 linajes celulares. En la terapia celular se pueden usar en el tratamiento de lesiones del aparato locomotor, insuficiencia renal, infarto de miocardio o lesiones de la médula espinal. Asimismo son un modelo útil para investigar los mecanismos que controlan la diferenciación y el metabolismo de los tejidos muscular y adiposo, así como en el desarrollo y estudio de nuevos 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 *in vitro* 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 satélite. Estas células están limitadas por su baja capacidad de proliferación, lo cual obliga a un aporte constante y en mayor frecuencia de nuevas células aisladas para sustituir a las células que han detenido su proliferación.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Proyecto PAPIIT IN200910 (UNAM, México) y es parte de la tesis doctoral (UNAM) de los dos primeros autores, los cuales contribuyeron de igual forma a su realización. Ambos agradecen al CONACYT la beca otorgada en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, México.

natural substances. 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 *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 isolated cells to substitute cells that have ceased to proliferate.

—End of the English version—

Literatura Citada

Abu-Remaileh, M., A. Gerson, M. Farago, G. Nathan, I. Alkalay, S. Zins Rousso, M. Gur, A. Fainsod, and Y. Bergman Y. 2010. Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/b-catenin signaling. EMBO J. 29: 3236-3248.

Ahmed, S., and A. N. Khosa. 2010. An introduction to DNA technologies and their role in livestock production: a review. J. Anim. Plant Sci. 20: 305-314.

Bhat, Z. F., and H. Fayaz. 2011. Prospectus of cultured meat – advancing meat alternatives. J. Food Sci. Technol. 48: 125-140.

Black, L. L., J. Gaynor, D. Gahring, C. Adams, D. Aron, S. Harman, D. Gingerich, and R. Harman. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joint: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. Vet. Ther. 8: 272-284.

Black, L. L., J. Gaynor, C. Adams, S. Dhupa, A. E. Sams, R. Taylor, S. Harman, D. A. Gingerich, and R. Harman. 2008. Effect of interarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. Vet. Ther. 9: 192-200.

Bonfield, T. L., M. T. Nolan Koloze, D. P. Lennon, and A. I. Caplan. 2010. Defining human mesenchymal stem cell efficacy *in vivo*. J. Inflammation (London, UK) 7: 51.

Borjesson, D. L., and J. F. Peroni. 2011. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. Clin. Lab. Med. 31: 109-123.

Bosnakovski, D., M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumura, and T. Fujinaga. 2005. Isolation and multilineage

cells for periodontal regeneration in dogs. Cells Tissues Organs 190: 94-101.

Liu, X., X. Li, Y. Fan, G. Zhang, D. Li, W. Dong, Z. Sha, X. Yu, Q. Feng, F. Cui, and F. Watari. 2010. Repairing goat tibia segmental bone defect using scaffold cultured with mesenchymal stem cells. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 94: 44-52.

Martin, D. R., N. R. Cox, T. L. Hatchcock, G. P. Niemeyer, and H. J. Baker. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp. Hematol. 30: 879-886.

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

Minguell, J. J., F. M. Florenzano, M. R. Ramírez, R. F. Martínez, and G. P. Lasala. 2010. Intracoronary infusion of a combination of bone marrow derived stem cells in dogs. Exp. Clin. Cardiol. 15: 17-20.

Mironov, V., T. Trusk, V. Kasyanov, S. Little, R. Swaja, and R. Markwald. 2009. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. Biofabrication 1 022001.

Nakano, S., Y. Inada, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Maruyama, Y. Yamazaki, N. Shibata, and K. Nakao. 2007. Bezafibrate regulates the expression and enzyme activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. Am. J. Physiol. Endocrinol Metab. 292: E1213-E1222.

Oh, H. J., M. K. Kim, G. Jang, H. J. Kim, S. G. Hong, J. E. Park, K. Park, S. H. Sohn, D. Y. Kim, N. S. Shin, and B. C. Lee. 2008. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. Theriogenology 70: 638-647.

Oh, H. J., J. E. Park, M. J. Kim, S. G. Hong, J. C. Ra, J. Y. Jo, S. K. Kang, G. Jang, and B. C. Lee. 2011. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. Theriogenology 75: 1221-1231.

Olby, N. 2010. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 40: 791-807.

Plánka, L., D. Starý, J. Hlučilová, J. Klima, J. Jančáï, L. Křen, J. Lorenzová, L. Urbanová, M. Chra, R. Srnec, M. Dvořák, P. Gál, and A. Nečas. 2009. Comparison of preventive and therapeutic transplantations of allogenic mesenchymal stem cells in healing of distal femoral growth plate cartilage defects in miniature pigs. Acta Vet. Brno 78: 293-302.

Quimby, J., T. L. Webb, D. S. Gibbons, and S. W. Dow. 2011. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. J. Feline Med. Surg. Feb 17 in press [Epub ahead of print].

Quintavalla, J., S. Uziel-Fusi, J. Yin, E. Boehnlein, G. Pastor, V. Blancuzzi, H. N. Sigh, K. H. Kraus, E. O'Byrne, and T. C. Pellas. 2002. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (mscs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. Biomaterials 23: 109-119.

Rhodes, N. P., and J. K. Srivastava. 2004. Metabolic and histological analysis of mesenchymal stem cells grown in 3-d hyaluronan-based scaffolds. J. Mater. Sci Mater. Med. 15: 391-395.

Ropka-Molik, K., R. Eckert, and K. Piórkovska. 2011. The expression pattern of myogenic regulatory factors MyoD, Myf6 and Pax7 in postnatal skeletal muscles. Gene Expr. Patterns 11: 79-83.

Rosen, E. D., and O. A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 885-896.

Rozemuller, H., H. J. Prins, B. Naaijkens, J. Staal, H. J. Bühring, and A. C. Martens. 2010. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies. Stem Cells Dev. 19: 1911-1921.

Sato, K., T. Yonemura, H. Ishii, M. Toyomizu, T. Kamada, and Y. Akiba. 2009. Role of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in chicken adipogenesis. Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol. 154: 370-375.

Shake, J. G., P. J. Gruber, W. A. Baumgartner, G. Senechal, J. Mayers, M. Redmond, M. F. Pittenger, and B. J. Martin. 2002. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. Ann. Thorac. Surg. 73: 1919-1926.

Silva, G. V., S. Litovski, J. A. Assad, A. L. Sousa, B. J. Martin, D. Vela, S. C. Coulter, J. Lin, J. Ober, W. K. Vaughn, R. V. Branco, E. M. Oliveira, R. He, Y. J. Geng, J. T. Willerson, and E. C. Perin. 2005. Mesenchymal stem cells diferentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. Circulation 111: 150-156.

Smith, R. K., M. Korda, G. W. Blunn, and A. E. Goodship. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. Equine Vet. J. 35: 99-102.

Smith, R. K. 2008. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. Disabil. Rehabil. 30: 1752-1758.

Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126: 663-676.

Tecirlioglu, R. T., J. Guo, and A. O. Trounson. 2006. Interspecies somatic cell nuclear transfer and preliminary data for horse-cow/mouse iSCNT. Stem Cell Rev. 2: 277-287.

Telugu, B. P. V. L., T. Ezashi, and R. M. Roberts. 2010. The promise of stem cell research in pigs and other ungulates species. Stem Cell Rev. 6: 31-41.

Vanderwall, D. K., G. Woods, J. F. Roser, D. Schlafer, D. C. Sellon, D. F. Tester, and K. L. White. 2006. Equine cloning: applications and outcomes. Reprod. Fertil. Dev. 18: 91-98.

Vidal, M., G. Kilroy, J. Johnson, M. Lopez, R. Moore, and J. Gimble. 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.

Vincentelli, A., F. Wautot, F. Juthier, O. Fouquet, D. Corseaux, S. Marechaux, T. Le Touneau, O. Fabre, S. Susen, E. Van Belle, F. Mouquet, C. Decoene, A. Prat, and B. Jude. 2007. *In vivo* autologous recellularization of a tissue-engineered valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 134: 424-432.

Violini, S., P. Ramelli, L. F. Pisani, C. Gorni, and P. Mariani P. 2009. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12. BMC Cell Biol. 10: 29.

Williams, J. B., T. Shin, L. Liu, G. Flores-Foxworth, J. Romano, A. Blue-McClendon, D. Kraemer, M. E. Westhusin. 2006. Cloning of exotic/endangered species: desert bighorn sheep. Methods Mol. Biol. 348: 169-182.

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.

Zhu, H. B., D. Z. Guo, S. J. Yang, Y. H. Zhang, H. Wang, H. T. Guo, Y. Zhang, and D. C. Cheng. 2008. Osteogenic action of the osteogenic growth peptide on bovine bone marrow mesenchymal stromal cells in culture. Veterinarni medicina 53: 501-509.