

# 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<sup>1</sup>, Jesús J. Ramírez-Espinosa<sup>1</sup>, Armando Shimada<sup>2</sup>,  
Anaíd Antaramian<sup>3</sup>, Enrique Piña<sup>4</sup>, Ofelia Mora<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. <sup>2</sup>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). <sup>3</sup>Instituto de Neurobiología, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. <sup>4</sup>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

### 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.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2011. Aprobado: mayo, 2012.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 46: 371-382. 2012.

los procesos de organogénesis. El mejor conocimiento de sus características favorecerá la manipulación de la diferenciación celular con el objetivo de resolver diversas problemáticas en múltiples 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 (Häkelién *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.*, 2000) 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 (Häkelién *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 morfologías 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 características 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 vasculogénesis 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.

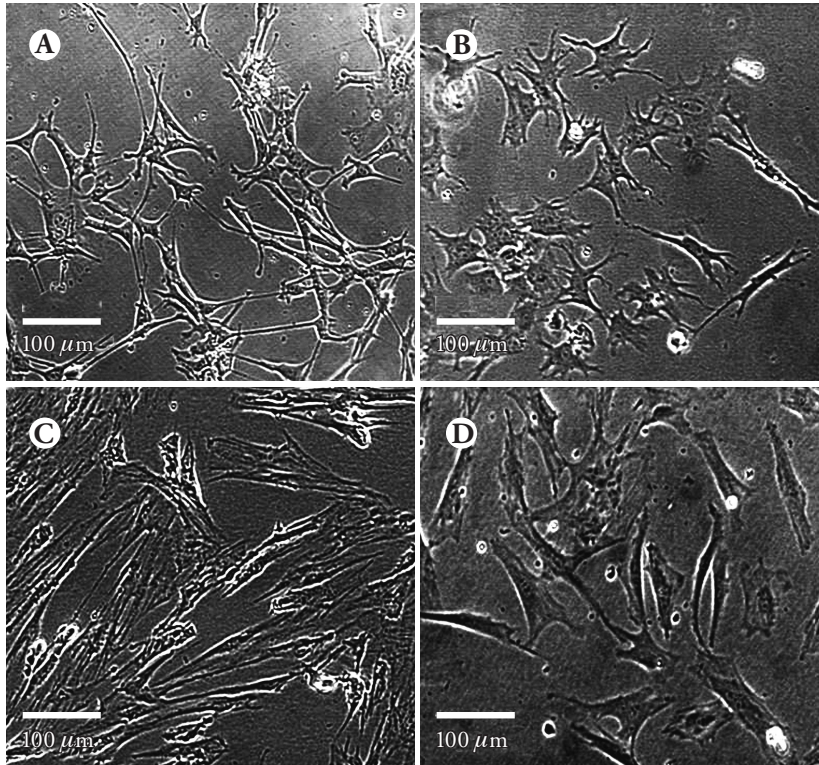
The endogenous functions of the MSCs in tissue repair are unclear. However, it has been determined that they increase proliferation and they control vasculogenesis by secreting cytokines and growth factors (interleukin 6 (IL-6), IL-11, leukemia inhibitory factor, and stimulating factor of colonies of 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  $4.9 \pm 1.6$  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  $4.9 \pm 1.6$  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 <sup>†</sup> MO	Rn <sup>‡</sup> MO	Hx <sup>§</sup> MO	Hx <sup>b</sup> UCB	Hx <sup>□</sup> TA	Ss <sup>††</sup> MO	Ss <sup>‡‡</sup> Der	Fc <sup>§§</sup> MO	Fc <sup>§§</sup> TA	Cf <sup>bP</sup> MO	Oa <sup>□□</sup> 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

<sup>†</sup>Ratón (Gnecchi y Melo, 2009). <sup>‡</sup>Rata (Carvalho *et al.*, 2008). <sup>§</sup>Humano (Strem *et al.*, 2005; Halfon *et al.*, 2011; Karaöz *et al.*, 2011). <sup>b</sup>Humano (Sarugaser *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2006). <sup>□</sup>Humano (Kern *et al.*, 2006). <sup>††</sup>Cerdo (Zeng *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2007). <sup>‡‡</sup>Cerdo (Ock *et al.*, 2010). <sup>§§</sup>Gato (Quimby *et al.*, 2011). <sup>bP</sup>Perro (Csaki *et al.*, 2007). <sup>□□</sup>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. <sup>†</sup>Mouse (Gnecchi and Melo, 2009). <sup>‡</sup>Rat (Carvalho *et al.*, 2008). <sup>§</sup>Human (Strem *et al.*, 2005; Halfon *et al.*, 2011 ; Karaöz *et al.*, 2011). <sup>b</sup>Human (Sarugaser *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2006). <sup>□</sup>Human (Kern *et al.*, 2006). <sup>††</sup>Pig (Zeng *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2007). <sup>‡‡</sup>Pig (Ock *et al.*, 2010). <sup>§§</sup>Cat (Quimby *et al.*, 2011). <sup>bP</sup>Dog (Csaki *et al.*, 2007). <sup>□□</sup>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 <sup>†</sup> MO	Pollo <sup>‡</sup> MO	Humano <sup>§b</sup> MO	Humano <sup>b</sup> TA	Humano <sup>b</sup> dermis	Humano <sup>b</sup> corazón
Oct-4	+	+ <sup>□</sup>	+	+	+	+
Nanog	+	+	+	+	+	+
Sox2	+	+	+	+	+	+
FoxD3	NE	NE	+	NE	NE	NE
Rex-1	NE	NE	+	NE	NE	NE
SSEA-4	NE	NE	+	+	+	+

<sup>†</sup>Ock *et al.* (2010). <sup>‡</sup>Khatri *et al.* (2009). <sup>§</sup>Karaöz *et al.* (2011). <sup>b</sup>Riekstina *et al.* (2009). MO: médula ósea; TA: tejido adiposo. <sup>□</sup>Nombrado PouV en pollos. + Expresión positiva reportada, NE no evaluado. <sup>‡</sup>Ock *et al.* (2010). <sup>‡</sup>Khatri *et al.* (2009). <sup>§</sup>Karaöz *et al.* (2011). <sup>b</sup>Riekstina *et al.* (2009). MO: bone marrow; TA: adipose tissue. <sup>□</sup>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  $\beta$  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),  $\beta$ -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,  $\beta$ -glycerophosphate, and ascorbic acid are added to the culture medium; the differentiation to chondrocytes is induced by the transforming growth factors  $\beta$ 1 and 3 (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3), 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,  $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico; la diferenciación a condrocitos se induce con los factores de crecimiento transformante  $\beta 1$  y  $3$  (TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 3$ ), 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 PPAR $\gamma$ y adiponectina, LPL	MCC (tinción con rojo oleoso) <sup>†</sup> MET <sup>§</sup> PCR, qPCR, WB, ICQ <sup>¶</sup> <sup>b</sup>
Condrocitos	Detección de proteoglicanos y colágena tipo II Expresión y síntesis de Sox9, aggrecan y colágena tipo II	MCC (tinción con azul alcian) <sup>□</sup> I-MET <sup>b</sup> PCR, qPCR, WB, ICQ <sup>¶</sup> <sup>a</sup>
Osteocitos	Depósito de minerales en matriz extracelular Expresión y síntesis de osteocalcina y osteopontina.	MCC (tinción con rojo de alizarina o Von Kossa) <sup>¶¶</sup> PCR, qPCR, WB, ICQ <sup>¶†</sup>

<sup>†</sup>Khatiri *et al.* (2009). <sup>§</sup>Eslaminejad *et al.* (2009). <sup>¶</sup>Bosnakovski *et al.* (2005). <sup>b</sup>Zhang *et al.* (2012).

<sup>□</sup>Eslaminejad y Nadri (2009). <sup>¶¶</sup>Mathews *et al.* (2012). <sup>¶¶</sup>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.

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—



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

- 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. Hoboken, 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. Skälhegg, 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 (mcs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176: 57-66.
- Mathews, S., S. A. Mathew, P. K. Gupta, R. Bhone, 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. Naaijken, 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. Rahrman, 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.