

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-Serrano¹, Jesús J. Ramírez-Espinosa¹, Armando Shimada²,
Anaid Antaramian³, Enrique Piña⁴, Ofelia Mora^{2,1*}

¹Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. ²Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. (ofemora66@unam.mx). ³Instituto de Neurobiología, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, estado de Querétaro. 76230, México. ⁴Facultad 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

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

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 46: 543-555. 2012.

troncales mesenquimales (CTM) se ha generado gran cantidad de información e investigación sobre la biología y las posibles aplicaciones de estas células, centrándose a la salud humana, y usando como modelos ratas y ratones o al propio humano. En otras especies domésticas la investigación se ha limitado principalmente en casos en los que alguna especie es un modelo compatible con la fisiología normal o algún padecimiento humano. La existencia de estos modelos ha promovido el estudio, aislamiento y caracterización de células mesenquimales de médula ósea (MO) de las principales especies de interés veterinario y pecuario (Cuadro 1).

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

Caracterización de células troncales mesenquimales de médula ósea de especies domésticas

Caninos

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

Felinos

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

of these models has promoted the study, isolation and characterization of bone marrow mesenchymal cells from the main species of interest to veterinary medicine or animal production (Table 1).

Because they proliferate rapidly and differentiate into diverse tissues, MSC are used experimentally to evaluate the effect of cell therapy on coronary thrombosis and myocardial ischemia (Huang *et al.*, 2006; Gandolfi *et al.*, 2011), heart valve reconstruction, intervertebral disc degeneration, reparation of fractures, hip replacement, spinal cord lesions (Jung *et al.*, 2009) or sclerosis (Bonfield *et al.*, 2010).

Characterization of bone marrow mesenchymal stem cells in domestic species

Canines

Csaki *et al.* (2007) characterized MSC of dog bone marrow and found a positive reaction to CTM CD105 and CD90 markers and negative for hematopoietic cell (HC) markers CD34 and CD45. They also differentiated the isolated cells into osteocytes, chondrocytes, and adipocytes. In that study, the cells differentiated into chondrocytes appeared ordered in nodules with circular cells in the center and cells with fibroblastoid morphology in the periphery, similar to the morphology of cartilage *in vivo*.

Felines

Martin *et al.* (2002) isolated and characterized MSC from feline bone marrow, and the frequency of these cells was 1 in 4.7×10^4 to 1 in 5.9×10^5 cells; of the total isolated cells. The cells expressed the MSC markers CD9 and CD44 and were negative for the HC marker CD45. They also differentiated these cells into adipocytes and osteocytes. Quimby *et al.* (2011) report similar results in this family for differentiation into adipocytes and osteocytes, and further, to chondrocytes.

Equines

In equines, Vidal *et al.* (2006) determined the proliferation and differentiation capacity of MSC. Cell duplication time was 1.4 ± 0.26 d, achieving

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 cardíacas	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 (Colleoni *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-Remaih *et al.*, 2010); this expression remains stable even after 90 cell duplications. The cells isolated by

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 bovinos, 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 morphology; the cells treated with chondrogenic medium exhibited rounded morphology and an increase in cell density with multi-layer formation, while the cells differentiated into adipocytes had lipid vacuoles.

Poultry

Studies 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 diferenciadas 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 identificación 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: tendinopatías, 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 % recurrence in lesions of the superficial digital flexor tendon after one year of follow-up (n=168), compared with 56 % recurrence in animals that followed the conventional rehabilitation program for this type of lesion.

In dogs there are studies on the use of bone marrow MSC and 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 $34 \pm 4.7\%$.

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 mucosal 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 terapéutico 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 (Técirlioglu

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 utilizarse 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 cruce 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 cruces 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 específica 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 transgenic 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

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—



(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.

LITERATURA CITADA

- Abu-Remaileh, M., A. Gerson, M. Farago, G. Nathan, I. Alkalay, S. Zins Rouso, 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

- differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 319: 243-253.
- Brevini, T. A. L., G. Pennarosa, L. Atanasio, A. Vanelli, B. Gasparrini, and F. Gandolfi. 2010. Culture conditions and signaling networks promoting the establishment of cell lines from parthenogenetic and biparental pig embryos. *Stem Cell Rev.* 6: 484-495.
- Buckingham, M., L. Bajard, T. Chang, P. Daubas, J. Hadchouel, S. Meilhac, D. Montarras, D. Rocancourt, and F. Relaix. 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* 202: 59-68.
- Chargé, S. B., and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84: 209-238.
- 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.
- 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* 3: 154-166.
- Crovace, A., L. Lacitignola, G. Rossi, and E. Francioso. 2010. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Vet. Med. Int.* doi 10.4061/2010/250978.
- Davoli, R., S. Braglia, V. Russo, L. Varona, and M. F. Pas. 2011. Expression profiling of functional genes in prenatal skeletal muscle tissue in duroc and pietrain pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 15-27.
- Dodson, M. V., G. J. Hausman, L. Guan, M. Du, T. P. Rasmussen, S. P. Poulos, P. Mir, W. G. Bergen, M. E. Fernyhough, D. C. McFarland, R. P. Rhoads, B. Soret, J. M. Reecy, S. G. Velleman, and Z. Jiang. 2010. Skeletal muscle stem cells from animals I. Basic cell biology. *Int. J. Biol. Sci.* 6: 465-474.
- 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.
- El-Menoufy, H., L. A. Aly, M. T. Aziz, H. M. Atta, N. K. Roshdy, L. A. Rashed, and D. Sabry D. 2010. The role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in treating formocresol induced oral ulcers in dogs. *J. Oral Pathol. Med.* 39: 281-289.
- Eslaminejad, M. B., F. Falahi, H. Nazarian, L. Taghiyar, and M. T. Daneshzadeh. 2007. Differentiation potential and culture requirements of mesenchymal stem cells from ovine bone marrow for tissue regeneration applications. *Iran. J. Vet. Surg.* 2: 53-65.
- Eslaminejad, M. B., M. Jafarian, A. Khojasteh, F. M. Abbas, M. M. Dehgahn, and R. Hassanizadeh. 2008. *In vivo* bone formation by canine mesenchymal stem cells loaded onto ha/tcp scaffolds: Qualitative and quantitative analysis. *Yakhteh Medical J.* 10: 205-212.
- 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.
- Gandolfi, F., A. Vanelli, G. Pennarossa, M. Rahaman, F. Acocella, and T. A. Brevini. 2011. Large animal models for cardiac stem cell therapies. *Theriogenology* 75: 1416-1425.
- Hall, M. N., W. S. Rosenkrantz, J. H. Hong, C. E. Griffin, and C. M. Mendelsohn. 2010. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet. Ther.* 11: E1-4.
- Hausman, G. J., M. V. Dodson, K. Ajuwon, M. Azain, K. M. Barnes, L. L. Guan, Z. Jiang, S. P. Poulos, R. D. Sainz, S. Smith, M. Spurlock, J. Novakofski, M. E. Fernyhough, and W. G. Bergen. 2009. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J. Anim. Sci.* 87: 1218-1846.
- Heo, Y. T., S. H. Lee, J. H. Yang, T. Kim, and H. T. Lee. 2011. Bone marrow cell-mediated production of transgenic chickens. *Lab. Invest.* Apr 25 [Epub ahead of print].
- Huang, S. D., F. L. Lu, X. Y. Xu, X. H. Liu, X. X. Zhao, B. Z. Zhao, L. Wang, D. J. Gong, Y. Yuan, and Z. Y. Xu. 2006. Transplantation of angiogenin-overexpressing mesenchymal stem cells synergistically augments cardiac function in a porcine model of chronic ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 132: 1329-1338.
- Jang, G., S. Hong, J. Kang, J. Park, H. Oh, C. Park, J. Ha, D. Kim, M. Kim, and B. Lee. 2009. Conservation of the sapsaree (*Canis familiaris*), a korean natural monument, using somatic cell nuclear transfer. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1217-1220.
- Jung, D. I., J. Ha, B. T. Kang, J. W. Kim, F. S. Quan, J. H. Lee, E. J. Woo, and H. M. Park. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* 285: 67-77.
- Kato, Y., H. Imabayashi, T. Mori, T. Tani, M. Taniguchi, M. Higashi, M. Matsumoto, A. Umezawa, and Y. Tsunoda. 2004. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. *Biol. Reprod.* 70: 415-418.
- Khatri, M., T. D. O'Brien, and J. M. Sharma. 2009. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev.* 18: 1485-1494.
- Kim, H. S., K. H. Kim, S. H. Kim, Y. S. Kim, K. T. Koo, T. I. Kim, Y. J. Seol, Y. Ku, I. C. Rhyu, C. P. Chung, and Y. M. Lee. 2010. Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells. *J. Periodontal Implant. Sci.* 40: 265-270.
- Langelaan, M. L. P., K. J. M. Boonen, R. B. Polar, F. P. T. Baaijens, M. J. Post, and D. W. J. Van der Schaft. 2010. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends Food Sci. Tech.* 21: 59-66.
- Lettry, V., K. Hosoya, S. Takagi, and M. Okumura. 2010. Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. *Jpn. J. Vet. Res.* 58: 5-15.
- Li, H., F. Yan, L. Lei, Y. Li, and Y. Xiao. 2009. Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem

- 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 11 β -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. Jančáň, 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. Piórkowska. 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. 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.
- 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 differentiate 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. Fert. 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.