



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA DE CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES BOVINAS OBTENIDAS DESDE
MÉDULA ÓSEA FETAL**

Diego Baltazar Araya Cordero

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: OSCAR ALEJANDRO PERALTA TRONCOSO

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile

Memoria financiada por proyecto FONDECYT 1100205

SANTIAGO, CHILE

2013



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA DE CÉLULAS
 MADRE MESENQUIMALES BOVINAS OBTENIDAS DESDE
 MÉDULA ÓSEA FETAL**

Diego Baltazar Araya Cordero

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : OSCAR PERALTA
PROFESOR CONSEJERO: MÓNICA DE LOS REYES
PROFESOR CONSEJERO: JOSE LUIS ARIAS

SANTIAGO, CHILE
2013

“AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (CMM) BOVINAS OBTENIDAS DESDE MÉDULA ÓSEA FETAL”

DIEGO B. ARAYA CORDERO*

*Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. Correo 2, Casilla 15, La Granja. Fono 56-02-9785638. Fax: 56-02-9785613.

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) son células indiferenciadas adultas, capaces de diferenciarse hacia múltiples tipos celulares incluyendo los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico. Previamente se han caracterizado CMM de varias especies como la humana, murina, ovina y felina entre otras. El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento de CMM desde médula ósea (MO) fetal bovina y la diferenciación adipogénica de CMM bajo condiciones *in vitro* durante 18 días. Las CMM fueron aisladas desde MO en base a su capacidad de adherencia al plástico. Las CMM fueron analizadas por PCR cuantitativo (Q-PCR) los días 0, 6, 12 y 18 para cuantificación de los genes endógenos *GAPDH* y β -*ACTINA*, de diferenciación adipogénica *PPAR γ -2*, *AP-2* y de pluripotencia *NANOG*. Se determinó un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm de *AP-2* en CMM diferenciadas los días 12 y 18 de cultivo (16,4 y 17 veces la expresión del día 0 y 2,2 y 5,1 veces la expresión del día 0 en los controles sin tratamiento). La expresión de *PPAR γ -2* y *NANOG* no mostró diferencias significativas entre tratamientos o días de cultivo. La expresión de la proteína *PPAR γ -2* fue detectada mediante inmunofluorescencia indirecta en las CMM diferenciadas el día 18 de cultivo. La adipogénesis fue confirmada en CMM diferenciadas por medio de la detección de vacuolas lipídicas. En base a estos resultados, se puede concluir que es posible aislar CMM bovinas desde MO fetal en base a su capacidad de adherencia al plástico. Las CMM obtenidas desde MO fetal bovina poseen el potencial de diferenciación adipogénica bajo condiciones *in vitro*.

Palabras Clave: médula ósea, células madre mesenquimales bovinas, multipotencia, diferenciación adipogénica.

“ISOLATION AND ADIPOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) COLLECTED FROM BOVINE BONE MARROW”

DIEGO B. ARAYA CORDERO*

*Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. Correo 2, Casilla 15, La Granja. Fono 56-02-9785638. Fax: 56-02-9785613.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are adult cells capable of differentiating into multiple cell types including osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. MSC have been isolated and characterized from several mammalian species including human, murine, ovine and feline. The present study aimed to isolate MSC from bovine fetal bone marrow (BM) and to induce the adipogenic differentiation of MSC during an 18 day differentiation period under in vitro conditions. MSC were isolated from BM based on the capacity for plastic adhesion. MSC were analyzed using quantitative PCR (Q-PCR) at days 0, 6, 12 and 18 for quantification of endogenous genes *GAPDH* and β -*ACTIN*, adipogenic genes *PPAR γ -2* and *AP-2* and pluripotency gene *NANOG*. An increase ($P < 0.05$) in the ARNm levels of *AP-2* was detected in differentiated MSC at days 12 and 18 of culture (16.4 and 17 fold the expression of day 0 and 2.2 and 5.1 fold the expression of day 0 in the untreated controls). The expression of *PPAR γ -2* and *NANOG* was not significantly different between treatments and days of culture. Expression of the *PPAR γ -2* protein was detected by indirect immunofluorescence at day 18 of culture associated to the nucleus of differentiated MSC. Adipogenesis was confirmed by detection of lipid vacuoles at day 18 of culture. Based on these results, we conclude that MSC can be isolated from BM based on their ability to adhere to plastic. Bovine MSC obtained from fetal BM had the potential to differentiate into the adipogenic lineage under in vitro conditions.

Key Words: bone marrow, bovine mesenchymal stem cells, multipotency, adipogenic differentiation.

1. INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (CMM) son células adultas indiferenciadas, con capacidad de auto-renovación y de diferenciación hacia distintos linajes celulares (Lakshmipathy y Verfaillie, 2005). Las CMM fueron aisladas y caracterizadas por primera vez desde medula ósea (MO) murina (Friedenstein *et al.*, 1966) y desde entonces se han detectado poblaciones de CMM en tejidos como el adiposo, pulpa dentaria, placenta, sangre umbilical y muscular entre otros (Rastegar *et al.*, 2010). Las poblaciones de CMM en estos tejidos son muy reducidas y en el caso de la MO humana, la proporción de CMM corresponde al 0,001-0,01% de la población celular total (Pittenger *et al.*, 1999). La Sociedad Internacional de Terapia Celular, ha establecido una serie de requisitos para la identificación de CMM, entre los que se encuentran: 1) capacidad de adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar, 2) perfil de antígenos de membrana positivo a CD105, CD73 y CD90 y negativo a CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 y MHC-II y 3) potencial de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico bajo condiciones *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006). Tras su aislamiento, las CMM pueden conservar su estado indiferenciado por periodos prolongados de cultivo (Friedenstein *et al.*, 1966). A partir del estado indiferenciado, es posible inducir su diferenciación bajo condiciones *in vitro* hacia los linajes mesenquimales antes descritos y también hacia tejidos no mesenquimales como el neuronal y cardiomiogénico (Rastegar *et al.*, 2010).

La mantención en cultivo de su capacidad multipotente y su potencial de diferenciación hacia distintos linajes celulares ha generado grandes expectativas para la utilización de las CMM en medicina regenerativa. Hasta el momento, la obtención y cultivo de CMM han sido reportadas en varias especies como la humana (Pittenger *et al.*, 1999), equina (De Schauwer *et al.*, 2011), ovina (Rentsch *et al.*, 2010), felina (Martin *et al.*, 2002), canina (Takemitsu *et al.*, 2012) y bovina (Colleoni *et al.*, 2005). Tales avances han permitido múltiples estudios en torno al potencial de las CMM en terapia de reparación cardíaca, ósea, muscular, hepática y tendinosa entre otras (Rastegar *et al.*, 2010; Santa María *et al.*, 2004). Las aplicaciones clínicas de las CMM son variadas, y entre las más reconocidas se describe su utilización en reparación ósea de huesos largos y cráneo en caninos y roedores (Kraus y Kirker-Head, 2006). Otra de las aplicaciones de CMM es su utilización para el tratamiento de lesiones músculo esqueléticas en equinos (Paris y Stout, 2010). Además, se ha comprobado la utilidad de las CMM en la reparación de heridas cutáneas en caninos (Kim *et al.*, 2013). Por otra parte, hay estudios que han buscado extender

el potencial terapéutico de las CMM al tratamiento de afecciones cardíacas, lo que ha sido estudiado en modelos experimentales murinos (Yokokawa *et al.*, 2008) y ovinos (Airey *et al.*, 2004). A pesar de las aplicaciones antes descritas, existen escasos reportes en la especie bovina.

Tradicionalmente se ha comprobado la capacidad multipotente de las CMM a través de su diferenciación *in vitro* en los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Friedenstein *et al.*, 1966; Pittenger *et al.*, 1999). Previamente, como parte de un proyecto de investigación, se ha realizado la caracterización de CMM obtenidas desde MO fetal bovina luego de su diferenciación hacia los linajes osteogénico y condrogénico (Ojeda *et al.*, 2011; Saldaña y Peralta, 2012). En el presente estudio se propone comprobar la capacidad de diferenciación adipogénica de las CMM bovinas con el objetivo de establecer el potencial multipotente de diferenciación de estas células.

La diferenciación adipogénica progresa en forma secuencial desde células madre indiferenciadas mesodérmicas, adipoblastos, preadipocitos y finalmente adipocitos maduros (Cornelius *et al.*, 1994). Una vez diferenciado, el adipocito maduro posee funcionalidad asociada al almacenamiento y liberación de triglicéridos en respuesta a un estímulo metabólico (Cornelius *et al.*, 1994). En distintos reportes se han descrito múltiples moléculas inductoras de linaje adipogénico, como la Insulina (Teruel *et al.*, 1996), Isobutilmetilxantina (Barry y Murphy, 2004), Indometacina (Lehmann *et al.*, 1997) y Dexametasona (Arutyunyan *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2006). Estos factores son capaces de aumentar el nivel de expresión de varios genes ligados al linaje adipocítico (Teruel *et al.*, 1996). La insulina promueve la expresión de la enzima ácido graso-sintasa (FAS) principal enzima lipogénica (Teruel *et al.*, 1996) cuya síntesis es regulada en parte por el Receptor Activado por Proliferadores Peroxisómicos Gamma (PPAR γ). La proteína PPAR γ se expresa ampliamente en tejido adiposo y posee funcionalidad de regulador de diferenciación adipogénica (Rosen y Spiegelman, 2001). Por su parte la fosfodiesterasa Isobutilmetilxantina (IBMX) presenta acción sinérgica junto a la Insulina, estimulando en conjunto la expresión de AP-2, proteína ligante de ácidos grasos y expresada en adipocitos (Sun *et al.*, 2003). La Indometacina, un antiinflamatorio no esterooidal, ha sido comúnmente utilizada para estudios de inducción adipogénica (Lehmann *et al.*, 1997). Su mecanismo de acción aún no ha sido completamente determinado, sin embargo, se ha reportado su efecto sobre la inhibición de la ciclooxigenasa 1 y 2, además de activar el receptor PPAR γ (Lehmann *et al.*, 1997). Dentro de los factores adipogénicos más estudiados se encuentra la Dexametasona, debido a su amplia utilización médica como antiinflamatorio esterooidal. La Dexametasona ejerce su efecto adipogénico mediante estimulación directa sobre

el gen *AP-2*, promoviendo su expresión en magnitud dosis dependiente (Cook *et al.*, 1988; Yin *et al.*, 2006).

La proteína *AP-2* se expresa abundantemente en el adipocito en donde está relacionada al metabolismo de ácidos grasos (Bernlohr *et al.*, 1997). Esta es una proteína exclusiva del linaje adipogénico, correspondiendo a un mediador clave en el metabolismo y transporte de ácidos grasos en la célula, componiendo entre un 1 a 3% de la proteína total del adipocito (Sun *et al.*, 2003). La proteína *AP-2* representa la principal proteína ligante de ácidos grasos, tanto en su nivel de expresión como de afinidad (Gregoire *et al.*, 1998; Bernlohr *et al.*, 1997). Además, en ensayos de diferenciación de CMM, la detección de *AP-2* sirve como indicador de diferenciación adipogénica en estado terminal (Sun *et al.*, 2003).

El marcador de linaje adipogénico *PPAR γ* es una proteína que forma parte de una superfamilia de receptores nucleares hormonales esteroideos y tiroideos (Fajas *et al.*, 1997; Lazar, 1999). Se han reportado dos isoformas principales de esta proteína, *PPAR γ -1* expresada en baja proporción en diferentes tejidos y *PPAR γ -2* cuya expresión es específica del tejido adiposo. *PPAR γ -2* se diferencia de *PPAR γ -1* por presentar 30 aminoácidos adicionales en su extremo N terminal (Kawai *et al.*, 2010). El receptor *PPAR γ -2* se expresa a través de la diferenciación adipogénica hasta el estado de adipocito maduro en donde se expresa en altos niveles (Lazar, 1999). El receptor *PPAR γ -2* actúa como regulador de diferenciación adipogénica por activación o silenciamiento de genes (Kawai *et al.*, 2010; Rosen y Spiegelman, 2001). La función de *PPAR γ -2* en el metabolismo del tejido adiposo también influye sobre el rol de la insulina, interacción que genera gran expectativa en el tratamiento farmacológico de diabetes tipo 2 (Kawai *et al.*, 2010; Lazar, 1999).

A medida que el proceso de diferenciación avanza, las células madre sufren la pérdida de su condición pluripotente inicial (Chambers y Tomlinson, 2009). Dentro de los marcadores de pluripotencia más conocidos en células madre embrionarias (CME), se encuentran los factores de transcripción *OCT4* y *NANOG* (Hatano *et al.*, 2004). Si bien su función aún no ha sido completamente esclarecida, estos factores de transcripción son necesarios para la mantención de pluripotencia y auto-renovación de CME, ejerciendo su acción sobre el ciclo celular y silenciando la expresión de genes que conducen a la diferenciación (Kashyap *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Pei, 2009; Pierantozzi *et al.*, 2011).

A pesar del notable avance del estudio sobre CMM en distintas especies, existen escasos reportes en la especie bovina. La verificación de la capacidad multipotente mediante la

determinación del gen *NANOG* y la cuantificación de genes de diferenciación adipogénica *PPAR γ -2* y *AP-2*, compone uno de los primeros pasos en la investigación del potencial de diferenciación de CMM en esta especie. El objetivo del presente estudio fue el de aislar CMM desde MO fetal bovina y posteriormente inducir su diferenciación adipogénica bajo condiciones *in vitro*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales

Se utilizaron fetos bovinos (n=3) de 8 a 9 meses de gestación provenientes de una planta faenadora. Los procedimientos realizados en el estudio fueron aprobados por el comité asesor de bioética del Fondo de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

2.2 Obtención de Células y Cultivo Celular

Los fetos fueron transportados en un contenedor térmico al laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los fémures fetales fueron separados de tejidos blandos y seccionados en la diáfisis utilizando una sierra. Posteriormente se realizó la aspiración de la médula ósea mediante una bránula de 18 G conectada a una jeringa de 10 mL con medio de colección (DMEM alto en glucosa 4,5 gr/L; GIBCO, Grand Island, USA) suplementado con 1000 UI de heparina, 100 μ g/mL de Estreptomina y 100 UI/mL de Penicilina. Las CMM se aislaron mediante un protocolo descrito previamente (Bosnakovski *et al.*, 2005). Brevemente, el aspirado de MO fue centrifugado dos veces en PBS (pH 7,4; Hyclone Laboratories, Utah, USA) y dos veces en medio de colección a 300 g por 5 min. Una vez lavado, el pellet fue aspirado y suspendido en medio de colección suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, BRL, USA) en botellas de cultivo de 25 mL (T75, Falcon, NJ, USA) y cultivado a 38,5 °C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de cuatro días de cultivo, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante cambio de medio de cultivo y lavado con PBS. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días y el pasaje de las células se realizó mediante remoción con 0,5% de tripsina/EDTA (Hyclone Laboratories, Utah, USA).

2.3 Diferenciación Adipogénica

La diferenciación adipogénica fue inducida bajo condiciones *in vitro* siguiendo un protocolo descrito previamente (Bosnakovski *et al.*, 2005). Las CMM provenientes de un primer o segundo pasaje fueron cultivadas en placas de cultivo celular a densidades de $2-5 \times 10^3$ células/ cm^2 utilizando un hemocitómetro hasta lograr 80 a 90% de confluencia en medio control consistente en DMEM alto en glucosa, suplementada con 10% suero fetal bovino, 100 UI/ml de Penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomicina y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Anfotericina. La diferenciación adipogénica se realizó mediante cultivo por 3 días en medio inductor consistente en DMEM alto en glucosa 4,5g/L (GIBCO BRL), 1 μM Dexametasona, 0.5 mM Indometacina, 10 $\mu\text{g/ml}$ Insulina, 100 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma-Aldrich MO, USA), 10% SFB (GIBCO BRL). Posteriormente, las CMM fueron cultivadas por 3 días en medio de mantención consistente en DMEM alto en glucosa (GIBCO BRL), 10 μg insulina y 10% SFB (GIBCO BRL). Esta estimulación se repitió tres veces completando un total de 18 días de tratamiento. Las células en el grupo control fueron cultivadas en medio sin presencia de factores de diferenciación, con el objetivo de descartar la diferenciación espontánea de las CMM.

2.4 Análisis Morfológico

La morfología de las CMM fue evaluada durante el periodo de cultivo mediante microscopía de contraste de fase utilizando un microscopio conectado a una cámara digital (MOTIC CO, Hong Kong, China).

2.5 Análisis de PCR Cuantitativo

La diferenciación adipogénica fue evaluada mediante la cuantificación del nivel de ARNm de los genes adipogénicos *PPAR γ -2* y *AP-2* y los controles endógenos *GAPDH* y *β -ACTINA* mediante PCR cuantitativo. Además se cuantificó los niveles de ARNm del gen de pluripotencia *NANOG*. La secuencia de los partidores utilizados se presenta en la Tabla 1. El RNA total fue aislado utilizando un minikit RNAeasy (QIAGEN Inc, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado y amplificado mediante un kit Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Brilliant II SYBR Green RT-PCR (Stratagene, CA, USA) utilizando un termociclador. Para la reacción de PCR se utilizó el kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, La

Jolla, CA, USA). La reacción de PCR consistió en: 12,5ul de Master Mix, 5uL de primers en concentración 200nM, 0,375uL de tinción de referencia ROX, 5,125uL de agua y 2uL de ADNc. La reacción fue cuantificada en un termociclador Step One (Applied Biosystems, CA, USA). La expresión relativa de los genes fue calculada mediante el método de $\Delta\Delta C_T$. El cálculo de $\Delta\Delta C_T$ se realizó considerando la expresión del día 0 (muestra con el mayor o menor valor de CT) como una constante arbitraria que fue restada del valor de expresión de las muestras para los días de muestreo 6,12 y 18. La expresión de los genes de diferenciación se expresó como valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados en el análisis de expresión génica

Gen	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	5' CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	5' TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG
<i>β-ACTINA</i>	5' CGCACCCTGGCATTGTCAT	5' TCCAAGGCGACGTAGCAGAG
<i>AP-2</i>	5' CTGGCATGGCCAAACCCA	5' GTACTTGTACCAGAGCACC
<i>PPARγ-2</i>	5' CGCACTGGAATTAGATGACAGC	5' CACAATCTGTCTGAGGTCTGTC
<i>NANOG</i>	5' GTGTTTGGTGAACCTCTCCTG	5' GGAATTGAAATACTTGACAG

2.6 Inmunodetección de PPARγ-2

Luego de 18 días de cultivo, las CMM fueron fijadas con Paraformaldehído al 2% por 10 minutos en placas de cultivo de 10 mm. Posteriormente, las CMM fueron lavadas con múltiples cambios de PBS y almacenadas a 4°C hasta su uso. Las CMM fueron permeabilizadas con una solución de Triton X-100 al 1% por 20 minutos. Luego las células fueron lavadas tres veces con PBS por 5 min cada una e incubadas con SFB al 10% por 30 minutos. PPARγ-2 fue inmunodetectado mediante incubación por 1 hora con anticuerpo primario IgG monoclonal anti-PPARγ-2 de ratón (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) diluidos en 10% suero de burro (1:50). Posteriormente, las CMM fueron incubadas por 30 min con una solución de anticuerpos secundarios IgG de burro anti ratón conjugados con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y diluidos en 10% suero de burro (1:500). Posteriormente las CMM fueron lavadas tres veces en

PBS. Las muestras fueron montadas con una solución de montaje con Diamino fenilindol diclorhidrato (DAPI) colorante de tinción fluorescente que se une al ADN (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). El control negativo consistió en una muestra de CMM permeabilizada con Triton X-100 e incubada con SFB, pero tratada con suero de burro en vez de anticuerpo primario. Las células se observaron y fotografiaron bajo microscopio invertido epifluorescente asociado a una cámara de fotomicroscopía E400 (Olympus, Tokyo, Japón).

2.7 Prueba de tinción Oil Red O

La presencia de vacuolas lipídicas en las CMM fue evaluada mediante la tinción Oil Red O en muestras de CMM al día 18 de cultivo. Las CMM fueron fijadas en Paraformaldehído al 4% por una hora. Luego, las CMM fueron incubadas en 0,2% Oil Red por dos horas, lavadas en agua y posteriormente teñidas con hematoxilina.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El experimento de diferenciación celular fue realizado en tres repeticiones ($n= 3$). Los valores fueron expresados como promedio y desviación estándar (DE). Se realizó la prueba de Shapiro Wilk para determinar la distribución normal de los datos, los que se transformaron a escala logarítmica para obtener normalidad. Los resultados de expresión génica fueron analizados por ANDEVA (Análisis de Varianza) con un nivel de significancia de $p<0,05$. Además se realizó el test de Duncan para contrastar los promedios de expresión para cada tratamiento y día de cultivo. Todos los análisis estadísticos fueron analizados utilizando el software InfoStat (2008, Córdoba, Argentina).

3. RESULTADOS

Las CMM bovinas obtenidas por aspirado de MO femoral desde fetos bovinos fueron cultivadas en monocapa y sometidas a múltiples pasajes durante 7 a 10 días, alcanzando 80% a 90% de confluencia. En esta etapa se observó una morfología celular heterogénea con formas fibroblastoides y poligonales (Figura 1). Durante el proceso de inducción de diferenciación, se observó una variación morfológica desde un patrón fibroblastoide (día 0 de cultivo), hasta la conformación de agregados celulares aislados (día 18 de cultivo). Hacia el final del periodo de

cultivo, fue posible distinguir vacuolas citoplasmáticas de coloración brillante, compatible con la morfología adipocítica (Figura 2).

El análisis por PCR cuantitativo permitió detectar un aumento ($P < 0,05$) en los niveles de ARNm del gen adipo-específico *AP-2* en el grupo de CMM diferenciadas, los días 12 y 18 de cultivo (16,4 y 17 veces la expresión del día 0 y 2,2 y 5,1 veces la expresión del día 0 los días 12 y 18 en los controles de CMM indiferenciadas) (Figura 3). No se detectaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de los genes *PPAR γ -2* o *NANOG* entre días de cultivo o tratamientos (Figura 4). El análisis de expresión de ARNm de los genes endógenos permitió establecer que el gen *β -ACTINA* posee mayor estabilidad que el gen *GAPDH* durante el proceso de diferenciación adipogénica. Los valores de Ct para *β -ACTINA* fluctuaron entre 14,4 y 20,9 (promedio= $17,4 \pm 2,2$ DE y rango 6,4) en CMM indiferenciadas y entre 14,9 y 22,5 (promedio= $17,4 \pm 1,4$ DE y rango 7,6) en CMM diferenciadas. En tanto que los valores de Ct para *GAPDH* fluctuaron entre 16,6 y 23,4 (promedio= $19,6 \pm 2,8$ DE y rango 6,7) en CMM indiferenciadas y entre 16,9 y 20,9 (promedio= $18,7 \pm 2,1$ DE y rango 4,03) en CMM diferenciadas.

El receptor nuclear *PPAR γ -2* fue inmunodetectado en CMM al día 18 de diferenciación. Se pudo observar una señal fluorescente específica asociada al núcleo celular, concordante con la naturaleza de este receptor. Sin embargo, no se detectó señal específica para *PPAR γ -2* en el control de CMM indiferenciadas ni en el control tratado con suero en vez de anticuerpo (Figura 5).

El análisis citoquímico por tinción Oil Red O, específico para lípidos, resultó positivo en todas las muestras de CMM diferenciadas el día 18 de cultivo. En estos cultivos se pudo observar una notable coloración rojiza asociada a vacuolas lipídicas citoplasmáticas (Figura 6). En cambio, no se detectó reacción positiva a Oil Red O en CMM controles indiferenciadas.

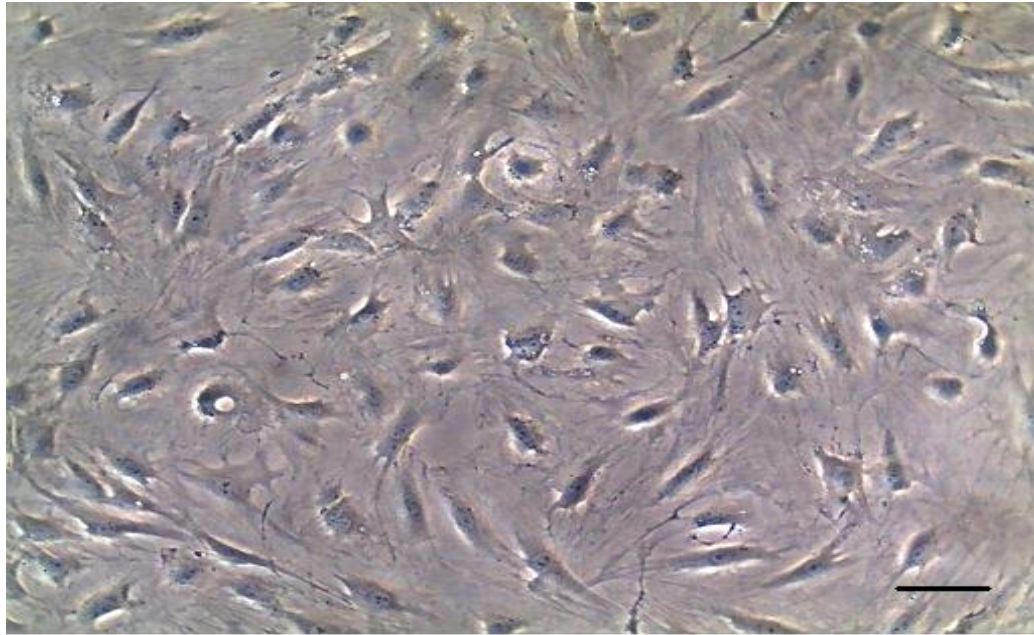


Figura 1. Microfotografía de contraste de fase de CMM bovinas aisladas en base a su capacidad de adherencia al plástico, luego de 6 a 8 días de cultivo y múltiples pasajes. Las CMM fueron cultivadas en monocapa presentando morfología fibroblastoide y poligonal. Barra= 25 μ m.

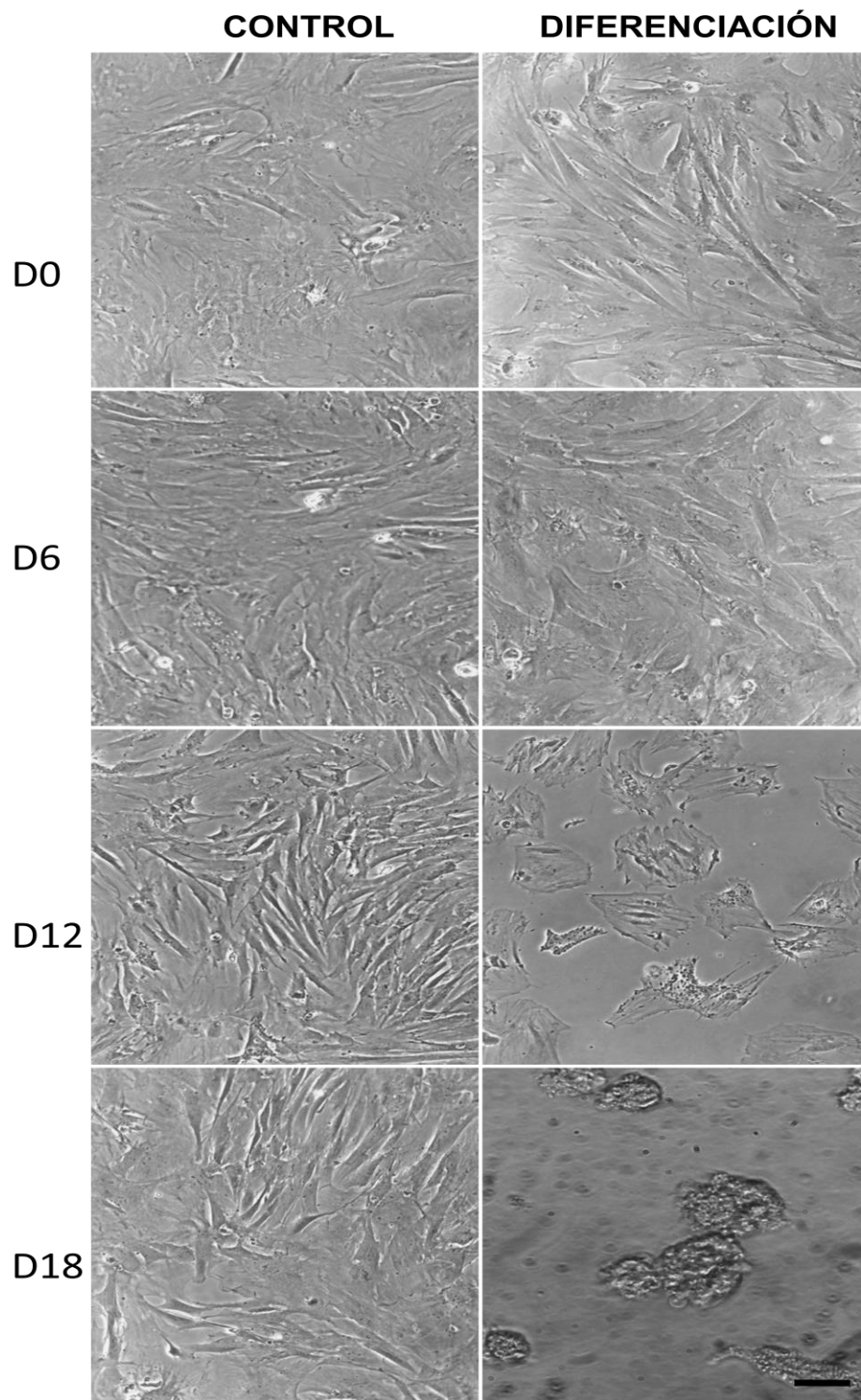


Figura 2. Microfotografías de contraste de fase de CMM cultivadas durante un periodo de 18 días bajo condiciones de diferenciación adipogénica y control. Se observa formación de agregados celulares aislados con vacuolas citoplasmáticas en CMM luego de 18 días de diferenciación. El grupo control conservó su apariencia fibroblastoide propia de CMM. Barra= 25 μm .

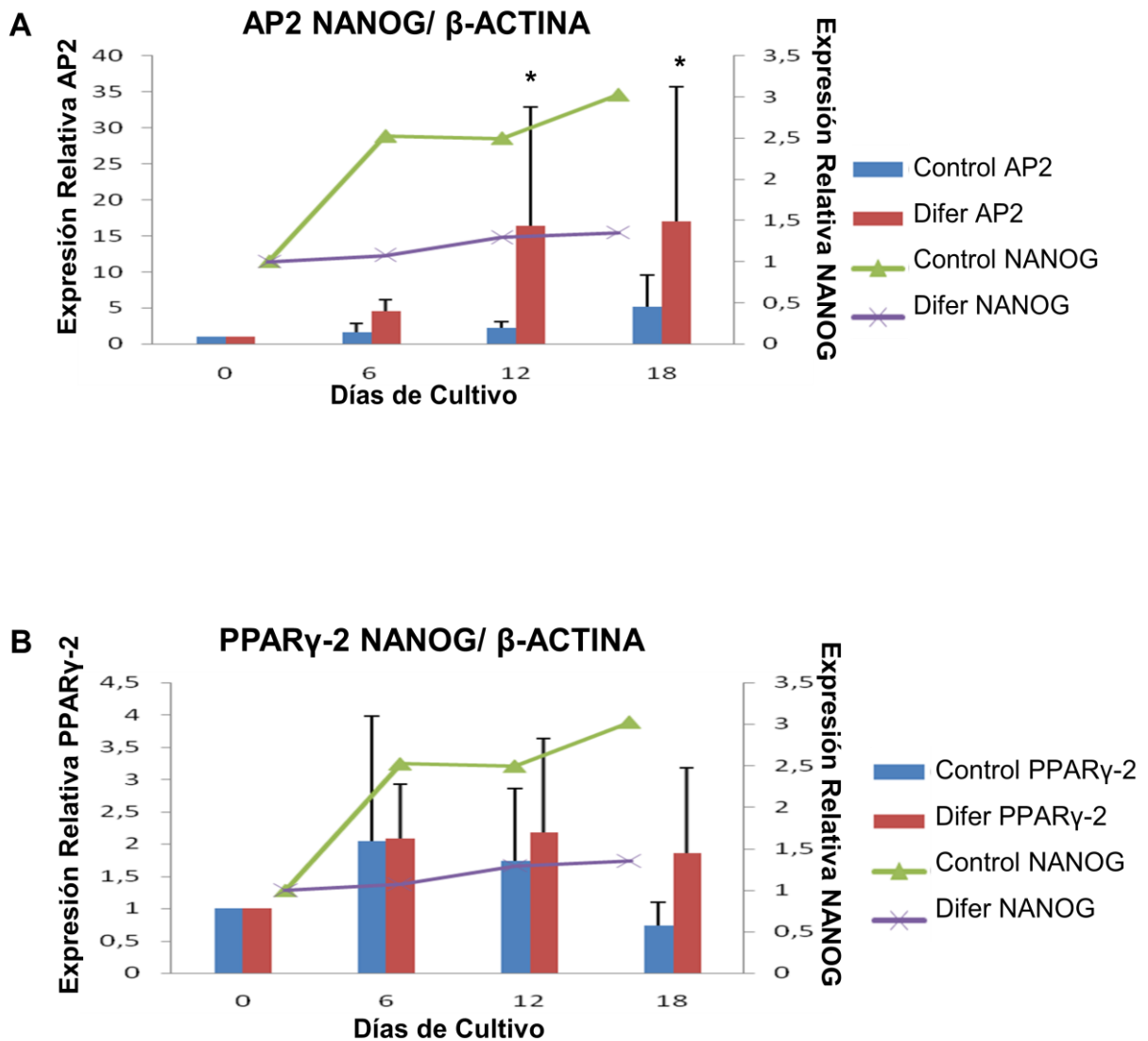


Figura 3. Expresión relativa de *AP-2*, *PPAR γ -2* y *NANOG* en relación al gen *β -ACTINA*. Las CMM fueron cultivadas durante un periodo de 18 días bajo condiciones de diferenciación adipogénica y control. Superíndice (*) indica diferencia significativa ($P < 0,05$) en la expresión de *AP-2* en relación a *β -ACTINA* (A) en CMM diferenciadas los días 12 y 18 de cultivo. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de *PPAR γ -2* o *NANOG*.

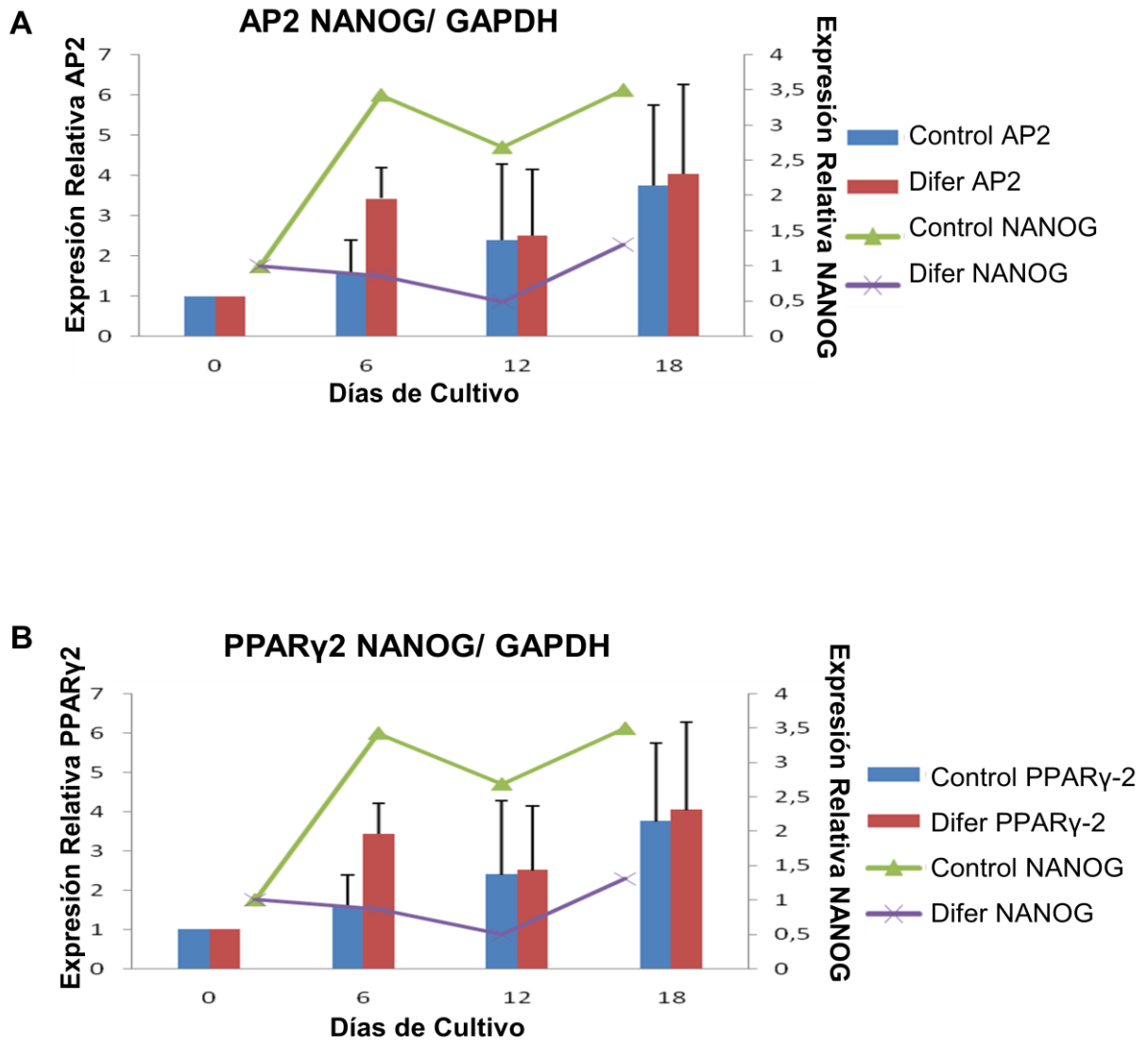


Figura 4. Expresión relativa de *AP-2*, *PPAR γ -2* y *NANOG* en relación al gen endógeno *GAPDH*. No se detectó diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm de *AP-2* (A), *PPAR γ -2* (B) y *NANOG* entre días de cultivo o tratamiento

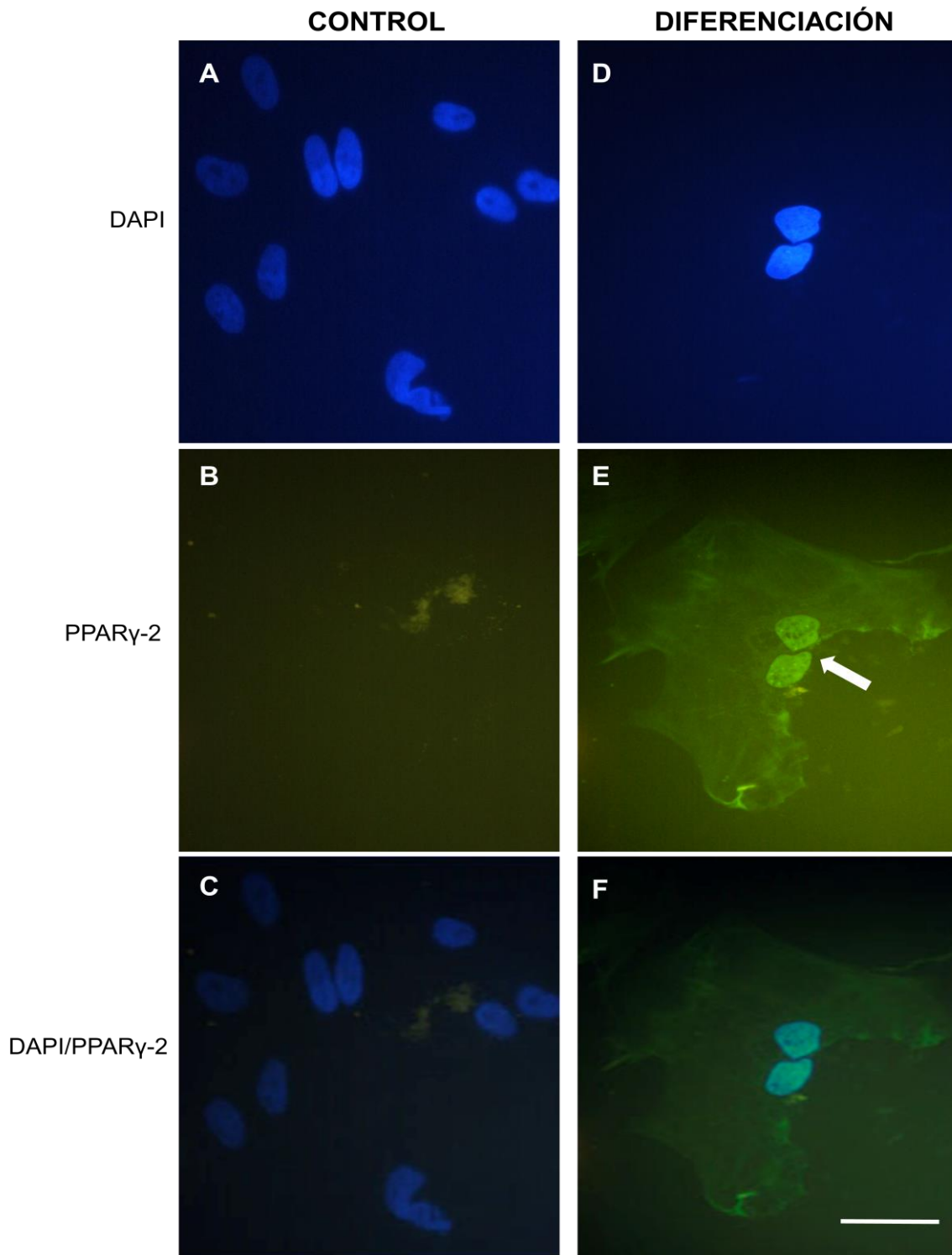


Figura 5. Inmunodetección del receptor nuclear PPAR γ -2 en CMM al día 18 de cultivo adipogénico. CMM cultivadas en medio control (A, B y C) y CMM diferenciadas (D, E y F). La inmunofluorescencia asociada a PPAR γ -2 (flecha blanca) se aprecia ubicada en el núcleo celular. El núcleo celular fue teñido con tinción DAPI (A y D). No se detectó reacción en CMM control indiferenciadas (B) Barra= 12,5 μ m.

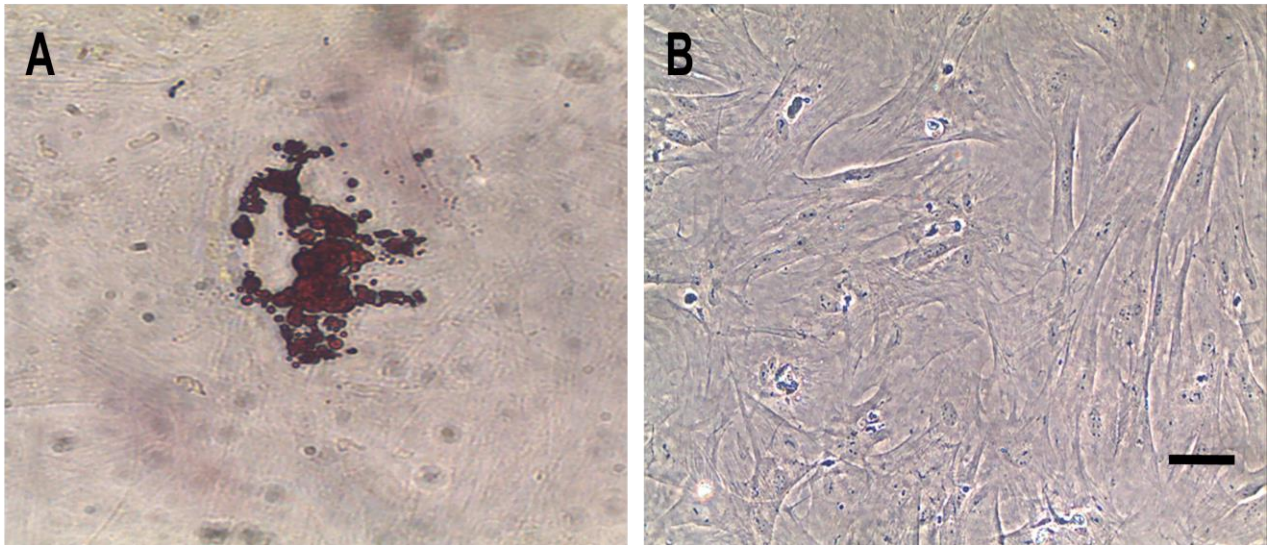


Figura 6. Detección de vesículas de lípidos mediante tinción Oil Red O en CMM bovinas al día 18 de diferenciación adipogénica. Se observan vacuolas lipídicas en el citoplasma de CMM diferenciadas (A) y reacción negativa para las CMM indiferenciadas de los controles (B). Barra= 12,5 μm .

4. DISCUSIÓN

El potencial multipotente de las CMM ha sido demostrado en varias especies animales (Rastegar *et al.*, 2010; De Shauwer *et al.*, 2011), sin embargo, existe escasa información disponible en la especie bovina. En el presente estudio, la capacidad multipotente de las CMM y su potencial de diferenciación ha sido determinado por la detección del gen de indiferenciación *NANOG* y de diferenciación adipogénica *PPAR γ -2* y *AP-2*. Las CMM bovinas fueron aisladas en base a su capacidad de adherencia al plástico desde MO obtenida de fetos derivados de matadero (Dominici *et al.*, 2006). La utilización de muestras de MO fetal provenientes de matadero posee varias ventajas entre las que se incluyen su amplia disponibilidad y bajo costo, además de evitar la necesidad de intervenir donantes vivos.

El aislamiento de CMM mediante su adherencia al plástico resultó ser un método eficiente y de bajo costo comparado con otros métodos como la citometría de flujo. La morfología inicial de las CMM aisladas resultó ser fibroblastoide y poligonal. La población celular obtenida por adherencia al plástico se ha identificado regularmente como CMM (Caplan, 1991; Horwitz *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha reportado que este extracto celular estaría compuesto por distintos subgrupos de CMM con variadas capacidades de diferenciación y proliferación celular (Baddoo

et al., 2003; Colter *et al.*, 2001; Kolf *et al.*, 2007). Durante los primeros 4 a 8 días desde su aislamiento, se observó una gran proliferación celular, realizándose sucesivos pasajes previos al experimento de diferenciación. La proliferación sostenida de las CMM *in vitro* se ha demostrado durante semanas y meses, no obstante esta capacidad es limitada y variable según especies y donantes (Rastegar *et al.*, 2010). El cultivo y expansión de las CMM fue realizado según protocolos previamente reportados (Bosnakovski *et al.*, 2005).

El potencial *in vitro* de diferenciación adipogénica ha sido establecido como uno de los criterios de clasificación de CMM según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici *et al.*, 2006). El laboratorio en donde se realizó esta investigación, ha realizado estudios previos que han demostrado la capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica de CMM bovinas aisladas desde la misma fuente de MO (Ojeda *et al.*, 2011; Saldaña y Peralta, 2012). Los resultados del presente estudio demuestran el potencial de diferenciación adipogénica de éstas células. Morfológicamente, las CMM bovinas obtuvieron apariencia fibroblastoide similar a las descritas en CMM humanas (Pittenger *et al.*, 1999) y murinas (Santa María *et al.*, 2004, Polisetti *et al.*, 2010). Posteriormente, la morfología celular se volvió más compacta y esférica conforme avanzó el estudio, adquiriendo un aspecto brillante e inclusión de vesículas citoplasmáticas lipídicas.

El aumento de expresión relativa del gen adipo-específico *AP-2*, los días 12 y 18 de cultivo evidencia la diferenciación adipogénica de las CMM tratadas. Éste resultado es similar al obtenido en ensayos de diferenciación adipogénica anteriores en la misma especie (Bosnakovski *et al.*, 2005) y en humanos (Pittenger *et al.*, 1999). En estos estudios se detectó un aumento en el nivel de expresión de *AP-2*, después de 2 o 3 semanas de cultivo bajo condiciones de diferenciación adipogénica. En estudios anteriores, se ha descrito que el gen *AP-2* es activado en menor magnitud por Insulina o Dexametasona en forma aislada, demostrándose que el efecto conjunto de ambos factores, como es el caso del presente estudio, ejerce un mayor nivel de expresión (Sun *et al.*, 2003). La adquisición de características adipocíticas en CMM diferenciadas fue reforzada mediante la tinción de lípidos acumulados en citoplasma por la técnica de Oil Red O. Esta técnica se encuentra bien establecida como indicadora de diferenciación adipogénica, siendo utilizada en ensayos de diferenciación en diversas especies (Bosnakovski *et al.*, 2005; Colleoni *et al.*, 2005).

El nivel de expresión de *PPAR γ -2* en CMM diferenciadas no resultó significativamente distinto en relación a CMM controles. A pesar de no mostrar diferencias significativas en relación a los

niveles de ARNm, PPAR γ -2 fue inmunodetectada en cultivos de CMM diferenciadas pero no en controles. Tal divergencia entre el resultado de Q-PCR y la prueba de inmunofluorescencia podría explicarse por la presencia de heterogeneidad en cuanto a la diferenciación de CMM en los cultivos. Las CMM diferenciadas sí demostraron la presencia del receptor PPAR γ -2, sin embargo, no fueron suficientes para mostrar niveles elevados de ARNm de PPAR γ -2 en relación a los controles. La falta de fluorescencia asociada a PPAR γ -2 en el control negativo es consecuencia de los bajos niveles de ARNm de este gen detectados en estas muestras.

El factor de transcripción NANOG tiene un rol clave en la mantención de la pluripotencia y auto-renovación en CME, compartiendo esta función en forma coordinada con los factores OCT4 y SOX2 (Hatano *et al.*, 2004; Pei, 2009). En estas células la reducción del nivel de NANOG se asocia al aumento del nivel de diferenciación como consecuencia del silenciamiento de genes relacionados a la mantención del estado pluripotente y de la activación de genes asociados a un linaje específico (Chambers y Tomlinson, 2009). Estudios anteriores han demostrado la detección de este marcador en CMM de la especie porcina (Liu *et al.*, 2013), canina (Takemitsu *et al.*, 2012), bovina (Bosnakovski *et al.*, 2005) y equina (Violini *et al.*, 2009). En el presente estudio, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de NANOG en CMM diferenciadas y controles. Si bien los niveles detectados de ARNm de este gen fueron aparentemente menores en CMM diferenciadas, tendencia esperable para el proceso de diferenciación, esta diferencia no resultó significativa. Esto puede explicarse en parte, por el bajo nivel de expresión de NANOG detectado tanto en CMM diferenciadas como controles. Si bien el nivel de expresión de NANOG no registró variación significativa, su detección en CMM bovinas demuestra que este marcador no es exclusivo de CME. Además, a pesar de no encontrarse bien establecida la función de NANOG en CMM, este factor podría cumplir un rol similar al que tiene en CME, donde mantiene el estado pluripotente (Tsai *et al.*, 2012). En definitiva, restan nuevos estudios para dilucidar el rol de NANOG en CMM (Takemitsu *et al.*, 2012).

El análisis de expresión relativa de genes requiere de la utilización de genes endógenos estables que permitan recoger datos fidedignos bajo condiciones experimentales (Thellin *et al.*, 1999). Los genes endógenos de elección deben idealmente conservar su nivel de expresión, sin variación respecto a las condiciones experimentales. Por lo tanto, un análisis de Q-PCR debe considerar el análisis de más de un gen endógeno que permita seleccionar el gen de mayor estabilidad (Fink *et al.*, 2008). Los controles endógenos GAPDH y β -ACTINA, están relacionados respectivamente a un catalizador metabólico energético y a un componente del

citoesqueleto (Fink *et al.*, 2008). Si bien *GAPDH* y β -*ACTINA* son ampliamente utilizados como controles endógenos en PCR (Thellin *et al.*, 1999), la medición de su expresión en este estudio indican que β -*ACTINA* resultó ser más estable que *GAPDH*. La utilidad de β -*ACTINA* ha sido reportada con anterioridad en estudios de diferenciación adipogénica en CMM bovinas (Bosnakovski *et al.*, 2005) y murinas (Karaoz *et al.*, 2009). Es probable que la variación del nivel de *GAPDH* responda mayormente a la influencia de la suplementación de Insulina en el medio de diferenciación, cuyo efecto altera los niveles del metabolismo celular y por lo tanto de la expresión de *GAPDH*. Estudios previos han reportado variación en los niveles de expresión de *GAPDH* y β -*ACTINA* bajo el efecto de distintos factores como la Hidrocortisona, Insulina y hormonas sexuales (Gorzelnik *et al.*, 2001; Ruan y Lai, 2007). Si bien el gen β -*ACTINA* participa en la conformación del citoesqueleto y su nivel de expresión de ARNm pudo haber sido fuertemente comprometido dado el cambio morfológico durante la diferenciación, su nivel de expresión resultó más estable que *GAPDH* para este estudio.

CONCLUSIÓN

El aislamiento de CMM en base a su capacidad de adherencia a las placas de cultivo de plástico demostró ser un método eficiente y de bajo costo comparativo a otros protocolos de aislamiento. El patrón de expresión del gen adipocítico *AP-2* y la inmunodetección de PPAR γ -2, junto a la presencia de vesículas lipídicas indican que las CMM aisladas desde MO fetal bovina poseen el potencial de diferenciación hacia el linaje adipogénico bajo condiciones *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este estudio fue posible al financiamiento del proyecto Fondecyt 1100205. Agradecemos la colaboración del Laboratorio Biovetec, al Laboratorio de Reproducción de FAVET y la Faenadora y Frigorífico Cordillera.

REFERENCIAS

- **AIREY, J. A.; ALMEIDA-PORADA, G.; COLLETTI, E. J.; PORADA, C. D.; CHAMBERLAIN, J.; MOVSESIAN, M.; SUTKO, J. L.; ZANJANI, E. D.** 2004. Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. 2004. *Circulation* 109: 1401-1407.
- **ARUTYUNYAN, I.; RZHANINOVA, A.; VOLKOV, A.; GOLDSTEIN, D.** 2009. Effect of dexamethasone on differentiation of multipotent stromal cells from human adipose tissue. *Bull Exp Biol Med* 147: 503-508.
- **BADDOO, M.; HILL, K.; WILKINSON, R.; GAUPP, D.; HUGHES C.; KOPEN G.; PHINNEY, D.** 2003. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Murine Bone Marrow by Negative Selection. *J Cell Biochem* 89: 1235–1249.
- **BARRY, F.; MURPHY, J.** 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 568–584.
- **BERNLOHR, D.; SIMPSON, M.; HERTZEL, A.; BANASZAK L.** 1997. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 17: 277-303.
- **BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T.** 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319: 243-253.
- **CAPLAN, A.** 1991. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res* 9: 641-650.
- **CHAMBERS, I.; TOMLINSON, S.** 2009. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136: 2311-2322.
- **COLLEONI, S.; DONOFRIO, G.; LAGUTINA, I.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G.** 2005. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7: 154-166.

- **COLTER, D. C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, DJ.** 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci* 98: 7841-7845.

- **COOK, J.; LUCAS, J.; SIBLEY, E.; BOLANOWSKI, M.; CHRISTY, R.; KELLY, T.; LANE, M.D.** 1988. Expression of the differentiation-induced gene for fatty acid-binding protein is activated by glucocorticoid and cAMP. *Proc Natl Acad Sci* 85: 2949-2953.

- **CORNELIUS, P.; MACDOUGALD, O.; LANE, M. D.** 1994. Regulation of Adipocyte Development. *Annu Rev Nutr* 14: 99-129.

- **DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.; VAN SOOM, A.** 2011. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 75: 1431-1443.

- **DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.** 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.

- **FAJAS, LL.; AUBOEUF, D.; RASPÉ, E.; SCHOONJANS, K.; LEFEBVRE A.M.; SALADIN, R.; NAJIB, J.; LAVILLE, M.; FRUCHART, J.C.; DEEB, S.; VIDAL-PLUIG, A.; FLIER, J.; BRIGGS, M.; STAELS, B.; VIDAL, H.; AUWERX, J.** 1997. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J Biol Chem* 272: 18779-18789.

- **FINK, T.; LUND, P.; PILGAARD, L.; RASMUSSEN, J. D.; DUROUX, M.; ZACHAR, V.** 2008. Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure. *BMC Mol Biol* 9: 98.

- **FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V.** 1966 Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embriol Exp Morphol* 16: 381-390.

- **GORZELNIAK, K.; JANKE, J.; ENGELI, S.; SHARMA, A.M.** 2001. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* 33: 625-627.
- **GREGOIRE, F.M.; SMAS, C.M.; SUL, H.S.** 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
- **HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A.** 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395.
- **KARAOZ, E.; AKSOY, A.; AYHAN, S.; EKER, A.; KAYMAZ, F.; KASAP, M.** 2009. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 132: 533-546.
- **KAWAI, M.; SOUSA, K.; MACDOUGALD, O.; ROSEN, C.** 2010. The many facets of PPAR γ : novel insights for the skeleton. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E3-E9.
- **KIM, J. W.; LEE, J. H.; LYOO, Y. S.; JUNG, D. I.; PARK, H. M.** 2013. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol* 24: 242-253.
- **KOLF, C.; CHO, E.; TUAN, R.** 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9: 204.
- **KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C.** 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 35: 232-242.
- **LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C.** 2005. Stem cell plasticity. *Blood Rev* 19: 29-38.
- **LAZAR, M.** 1999. PPAR γ in Adipocyte Differentiation. *J Anim Sci* 77: 16-22.

- **LEHMANN, J.; LENHARD, J.; OLIVER, B.; RINGOLD, G.; KLIEWER, S.** 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 6: 3406-3410.
- **LIU, T.; WU, Y. N.; GUO, X. M.; HUI, J.; LEE, E. H.; LIM, B.** 2009. Effects of Ectopic Nanog and Oct4 Overexpression on Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* 18: 1013-1021.
- **LIU, Y.; LIU, L.; MA, X.; YIN, Y.; TANG, B.; LI, Z.** 2013. Characteristics and neural-like differentiation of mesenchymal stem cells derived from foetal porcine bone marrow. *Biosci Rep* 33: 351-360.
- **LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- **MARTIN D.; COX N.; HATCHCOCK T.; NIEMEYER G.; BAKER H.** 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30: 879-886.
- **OJEDA, M. N.; FERNÁNDEZ, S.; SÁENZ, L.; ARIAS, I.; PALOMINO, J.; PERALTA, O. A.** 2011. Isolation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bovine blood marrow. 1st Latin American Symposium of Animal Reproduction, Viña del Mar, Chile.
- **PARIS, D.; STOUT, T.** 2010. Equine embryos and embryonic stem cells: Defining reliable markers of pluripotency. *Theriogenology* 74: 516- 524.
- **PEI, D.** 2009. Regulation of Pluripotency and Reprogramming by Transcription Factors. *J Biol Chem* 284: 3365-3369.
- **PIERANTOZZI, E.; GAVA, B.; MANINI, I.; ROVIELLO, F.; MAROTTA, G.; CHIAVARELLI, M.; SORRENTINO, V.** 2011. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 20: 915-923.

- **PITTENGER, M.; MACKAY, A.; BECK, S.; JAISWAL, R.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.; MOORMAN, M.; SIMONETTI, D.; CRAIG S.; MARSHAK, D.** 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 143: 143-147.
- **POLISETTI, N.; V. G., C.; PRAKASH, P.; VEMUGANTI, G.** 2010. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India* 58: 201-208.
- **RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.; HE, B.; CHEN, L.; ZUO, G.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.; KIM, S.; ZHOU, J.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R.; LUU, H.; HAYDON, R.; DENG, Z.; HE, T.** 2010. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2: 67-80.
- **RENTSCH, C.; HESS, R.; RENTSCH, B.; HOFMANN, A.; MANTHEY, S.; SCHARNWEBER, D.; BIEWENER, A.; ZWIPP, H.** 2010. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their 24steogénico differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell Dev Biol* 46: 624-634.
- **ROSEN, E.; SPIEGELMAN, R.** 2001. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem* 276: 37731-37734.
- **RUAN, W.; LAI, M.** 2007. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 385: 1-5.
- **SALDAÑA, C.; PERALTA, O.A.** 2012. Isolation and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) from bovine fetuses. *Proceedings of the 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)* 47, 4, 581.
- **SANTA MARIA, L.; ROJAS, C.; MINGUELL, J.** 2004. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 300: 418-426.

- **SUN, L.; NICHOLSON, C.; HAJJAR, D.; GOTTO, A.; HAN, J.** 2003. Adipogenic differentiating agent regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J Lipid Res* 44: 1877-1886.

- **TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI, T.** 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 8: 150.

- **TERUEL, T.; VALVERDE, A.; BENITO, M.; LORENZO, M.** 1996. Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J* 319: 627-632.

- **THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E.** 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295.

- **TSAI, C. C.; HUNG, S. C.** 2012. Functional roles of pluripotency transcription factors in mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*11: 3711-3712.

- **VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L. F.; GORNI, C.; 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. *BMC Cell Biol* 10: 29.

- **YIN, L.; LI, Y.; WANG, Y.** 2006. Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. *Chin Med J* 119: 581-588.

- **YOKOKAWA, M.; OHNISHI, S.; ISHIBASHI-UEDA, H.; OBATA, H.; OTANI, K.; MIYAHARA, Y.; TANAKA, K.; SHIMIZU, W.; NAKAZAWA, K.; KANGAWA, K.; KAMAKURA, S.; KITAMURA, S.; NAGAYA, N.** 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells improves atrioventricular conduction in a rat model of complete atrioventricular block. *Cell Transplant* 17: 1145-1455.