



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SKGM-2  
Bullet kit COMO INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA  
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE  
MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

**Paloma Paz Cordero Lorca**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción animal

PROFESOR GUÍA: Dr. Oscar Peralta Troncoso  
Departamento de Fomento de la Producción Animal  
Proyecto VID ENLACE UNIVERSIDAD DE CHILE 69975 2014

SANTIAGO, CHILE  
2016



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SKGM-2  
Bullet kit COMO INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA  
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE  
MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

**Paloma Paz Cordero Lorca**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción animal

Nota Final: .....

Profesor Guía: Óscar Peralta T. ....  
Profesor Consejero: Mónica De Los Reyes S. ....  
Profesor consejero: Víctor Hugo Parraguez. ....

Memoria de Título

**“Evaluación del efecto del medio de cultivo SKGM-2 Bullet kit como inductor de diferenciación miogénica de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea fetal bovina”**

**“Evaluation of the effect of SKGM-2 Bullet kit culture media on myogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow”**

Paloma P. Cordero L.<sup>1</sup>, Lic. Med. Vet., Universidad de Chile.

<sup>1</sup> Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.  
[Paloma.cordero@veterinaria.uchile.cl](mailto:Paloma.cordero@veterinaria.uchile.cl)

Proyecto VID ENLACE UNIVERSIDAD DE CHILE 69975 2014

## **EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SKGM-2 Bullet kit COMO INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA FETAL BOVINA**

Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

### **RESUMEN**

Las células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, MSC) son células con capacidad de auto renovación y potencial de diferenciación hacia linajes celulares mesodérmicos incluyendo el linaje miogénico. Éste último, no ha sido demostrado en la especie bovina, a pesar de su utilidad en este modelo de animales de abasto. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del medio comercial SKGM-2 Bullet kit como inductor de diferenciación miogénica en MSC bovinas, derivadas de médula ósea fetal. Las MSC fueron aisladas desde médula ósea de un feto bovino (7-9 meses de gestación) y posteriormente fueron cultivadas en medio de diferenciación SKGM-2 Bullet kit por 21 días. La expresión de marcadores músculo-específicos (MYF5, MYF6, MYOD1, MYOG y DES) fue analizada en MSC durante el proceso de diferenciación mediante PCR cuantitativo (Q-PCR) e inmunofluorescencia. Se detectó un aumento ( $P < 0,05$ ) de los niveles de mRNA de *MYOD1* en MSC expuestas a medio de diferenciación los días 7 y 21 de cultivo. En forma similar, se detectó un aumento ( $P < 0,05$ ) de los niveles de mRNA de *MYOG* y *DES* en MSC diferenciadas los días 7, 14 y 21 de cultivo. En comparación, los niveles de mRNA de *MYF5* y *MYF6* no fueron distintos ( $P > 0,05$ ) en MSC diferenciadas en relación al día 0 para los días de cultivo. Adicionalmente, las proteínas de MYF5 y DES fueron inmunodetectadas en cultivos de MSC el día 21 de diferenciación. En conclusión, las MSC fetales bovinas expuestas al medio SKGM-2 Bullet kit alcanzaron un estado intermedio o tardío de diferenciación miogénica caracterizado por un patrón de expresión de marcadores músculo-específicos similar a la etapa de mioblasto temprano.

Palabras Clave: Células madre mesenquimales, Diferenciación miogénica, SKGM-2 Bullet kit.

# **EVALUATION OF THE EFFECT OF SKGM-2 Bullet kit CULTURE MEDIA ON MYOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM BOVINE FETAL BONE MARROW**

Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

## **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSC) possess the capacity of self-renewal and differentiation into mesodermal lineages including myogenic. This myogenic differentiation potential of bovine MSC has not been demonstrated despite its usefulness for the study of this livestock animals model. The aim of this study was to evaluate the effect of commercial media SKGM-2 Bullet kit as a myogenic differentiation inducer in MSC derived from fetal bovine bone marrow. MSC were isolated from bone marrow derived from one bovine fetus (7-9 months of gestation) and were cultured in SKGM-2 Bullet kit differentiation media for 21 days. Gene expression of muscle-specific markers (*MYF5*, *MYF6*, *MYOD1*, *MYOG* and *DES*) was analyzed in differentiating MSC by quantitative PCR (Q-PCR) and immunofluorescence. An increase ( $P < 0.05$ ) in mRNA levels of *MYOD1* days 7 and 21 of culture. Similarly, an increase in mRNA levels of *MYOG* and *DES* was detected in differentiating MSC at days 7, 14 and 21 of culture compared to day 0. In comparison, levels of mRNA of *MYF5* and *MYF6* were not different ( $P > 0.05$ ) in differentiating MSC compared to day 0 during all the culture period. Additionally, MYF5 and DES were immunodetected in differentiated MSC at day 21 of culture. In conclusion, bovine fetal MSC exposed to the SKGM-2 Bullet kit media achieved an intermediate/late stage of myogenesis, characterized by a pattern of muscle-specific marker expression similar to the stage of early myoblast.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Myogenic differentiation, SKGM-2 Bullet kit.

## INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells, MSC) son células con capacidad de auto renovación y potencial de diferenciación hacia linajes celulares mesodérmicos (Salem y Thiemermann, 2010). Se localizan en diversos tejidos como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y placenta (Díaz *et al.*, 2014). Dado su potencial de autorenovación y diferenciación, las MSC participan en la regeneración y reemplazo de tejidos, siendo capaces de diferenciarse principalmente hacia linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico (Augello *et al.*, 2010; Salem y Thiemermann, 2010). Por consecuencia, la capacidad de diferenciación miogénica de las MSC ha despertado interés sobre su potencial uso en medicina regenerativa, mediante su aplicación en terapia celular para el tratamiento de diversas patologías de tipo músculo-esqueléticas (Salem y Thiemermann, 2010).

Además de su potencial de diferenciación *in vivo*, se ha descrito que las MSC pueden ser diferenciadas *in vitro* hacia linaje miogénico. Sin embargo, este potencial es controvertido ya que se ha descrito que las MSC obtenidas desde diferentes tejidos (médula ósea, hígado, timo y bazo) y expuestas a factores inductores no presentan potencial de diferenciación miogénica uniforme (Gornostaeva *et al.*, 2006). Esto sugiere que el potencial miogénico de las MSC varía según su origen tisular y el medio de exposición celular *in vitro* (Gornostaeva *et al.*, 2006). En este sentido, la diferenciación *in vitro* de las MSC dependerá no sólo de su potencial intrínseco predeterminado, sino también de estímulos de inducción química, producto del efecto de factores bioactivos, citoquinas, factores de crecimiento, entre otros (Banas *et al.*, 2007). Es por esto que el estudio de distintos factores de diferenciación permite formular medios de cultivo eficientes para la inducción miogénica de MSC.

El uso de un modelo celular bovino para estudios de miogénesis en MSC tiene varias ventajas en relación a otros modelos animales. Por una parte, el estudio de la miogénesis en el bovino permite generar información sobre este proceso y la potencial utilización de factores moduladores de la expresión de genes miogénicos, adipogénicos y fibrogénicos que condicionan la composición del músculo y consecuentemente de la carne, tanto en su rendimiento cuantitativo como cualitativo (Ruiz, 2014). Por otra parte, el uso de un modelo

de animal grande, cuya biomecánica y longevidad es de mayor similitud a la humana que el modelo murino, permite de mejor manera el desarrollo de estudios clínicos con potencial aplicación regenerativa en el tratamiento de patologías músculo-esqueléticas, como artropatías (artritis, artrosis), atrofas musculares, miopatías de diversas causas, entre otras (Bosnakovski *et al.*, 2005). El medio *Skeletal Muscle Growth Media* (SKGM-2), conocido como Bullet kit, es una formulación comercial desarrollada para el cultivo y la diferenciación de mioblastos. Su utilización como medio inductor miogénico ha sido reportada en MSC derivadas de tejido adiposo humano (Stern-Straeter *et al.*, 2014); sin embargo, no existen estudios similares en animales domésticos. En el presente estudio se propone evaluar el efecto del medio SKGM-2 Bullet kit como inductor de diferenciación miogénica en MSC derivadas desde médula ósea fetal bovina.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC fueron descritas inicialmente por el patólogo ruso Alexander Friedenstein, como un tipo celular no-hematopoyético de morfología fibroblastoide, con capacidad de adherencia a placas de cultivo de plástico y un alto potencial de proliferación y diferenciación celular (Friedenstein *et al.*, 1970). Su presencia en la médula ósea humana varía en una proporción de 0,001-0,01% en relación a la población celular total (Pittenger *et al.*, 1999). Recientemente la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido criterios mínimos para la definición de MSC humanas, que incluyen: 1) adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; 2) expresión de marcadores CD105, CD73, CD90 y ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR y 3) capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, condroblastos y adipoblastos (Dominici *et al.*, 2006; Salem y Thiemermann, 2010). Estos criterios mínimos pueden ser aplicados a MSC derivadas de otros modelos; sin embargo, existen variaciones entre especies animales. Diversos estudios han reportado propiedades de diferenciación multipotencial de las MSC hacia tejidos osteogénico, condrogénico, adipogénico y miogénico (Prockop, 1997; Caplan y Bruder, 2001; Augello *et al.*, 2010; Salem y Thiemermann, 2010). Adicionalmente, se ha establecido que el potencial de diferenciación de las MSC abarca más allá del linaje mesodérmico, pudiendo diferenciarse hacia linaje endodérmico (hepatogénico) y ectodérmico (neurogénico) (Woodbury *et al.*, 2000; Safford *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004, Cortés *et al.*, 2013). Este potencial de diferenciación hacia capas germinales distintas a la mesodérmica es conocido como “plasticidad celular”. Sin embargo, hasta el presente no existen estudios que hayan demostrado esta propiedad bajo condiciones *in vivo*.

Dada sus propiedades celulares innatas y características de cultivo, actualmente se estudia el uso de las MSC en terapia celular. Algunas de las propiedades que alientan este uso potencial corresponden a su fácil aislamiento, alto potencial de proliferación *in vitro* y gran potencial de diferenciación celular. Adicionalmente, las MSC poseen propiedades inmunomoduladoras de la respuesta inmune del organismo receptor, lo que favorece su

factibilidad en trasplantes alógenos con un mayor éxito terapéutico (Salem y Thiernemann, 2010). Las MSC también se caracterizan por poseer un potencial de migración hacia el sitio lesionado, propiedad que es conocida como “homing” (Salem y Thiernemann, 2010). Estas capacidades, además de sus menores restricciones del punto de vista ético comparado con las células madre embrionarias, hacen de las MSC una herramienta interesante de aplicación en medicina regenerativa (Salem y Thiernemann, 2010).

### **Miogénesis durante el desarrollo embrionario**

La miogénesis durante el desarrollo embrionario está regulada por la expresión de genes que codifican la traducción de factores celulares que controlan la progresión de las MSC hacia el linaje miogénico. Algunos de estos genes se conocen como MRF (*Myogenic Regulatory Factors*), pertenecientes a la familia de factores de transcripción básicos helix-loop-helix (bHLH) (Shibata *et al.*, 2006). Dentro de los MRF más relevantes se encuentran Miogenina D (MYOD1), Miogenina (MYOG), Factor miogénico 5 (MYF5) y Factor miogénico 6 (MYF6 y/o MYF4) (Ropka-Molik *et al.*, 2011; Castro, 2012). El proceso de miogénesis se compone de cuatro etapas; proliferación, determinación, diferenciación y maduración celular (Castro, 2012) donde los MRF juegan un rol clave, especialmente en la determinación y diferenciación muscular. Por lo cual, la participación de los MRF en el desarrollo celular se considera desde su estado de precursor mioblástico hasta su diferenciación en miocito maduro (Sambasivan y Tajbakhsh, 2007). Los MRF en conjunto con la familia de proteínas potenciadores de miocitos (MEF2), reguladores miogénicos de la familia de las proteínas E (MRFE) y otros factores músculo-específicos, se encargan de controlar la expresión génica durante la miogénesis. Adicionalmente, MRF junto con MRFE se unen a la secuencia consenso E-box CANNT, presente en los promotores de genes músculo-específicos (Parker *et al.*, 2003). Por lo tanto, la miogénesis es controlada a partir de factores de regulación cuya función es inhibir y/o estimular el desarrollo y crecimiento del tejido muscular (Parker *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2013). En este sentido se considera que la acción de la familia MRF en su mayoría resulta en la activación de genes de transcripción miogénica (Shibata *et al.*, 2006).

El proceso de miogénesis se inicia con una fase proliferativa mediante inducción mioblástica (Le Grand y Rudnicki, 2007). La codificación de los MRF se da posterior a esta proliferación, en las fases de determinación y diferenciación miogénica (Charge y Rudnicki 2004; Castro, 2012). MYOD1 y MYF5 son factores que actúan en la etapa de determinación, donde su expresión produce estimulación de las células del somita hacia el linaje mesodérmico. Por lo tanto, la carencia de estos factores llevará a la ausencia de mioblastos esqueléticos (Charge y Rudnicki 2004; Castro, 2012). Se describe que MYOD1 actúa en la diferenciación del mioblasto esquelético y MYF5 regula la tasa de proliferación mioblástica (Le Grand y Rudnicki, 2007). Por otra parte, MYOD1 se encarga de regular la diferenciación del mioblasto, aumentando, a su vez, la activación transcripcional de varios genes como MYOG y activando otros factores reguladores de tipo negativos (Ropka-Molik *et al.*, 2011). El factor MYOG se activa en la siguiente etapa de diferenciación y resulta esencial para la etapa terminal de los mioblastos comprometidos (Castro, 2012). En consecuencia, MYOG es de gran importancia en la formación de miotubos y fibras musculares (Le Grand y Rudnicki, 2007). Por otra parte, MYF6 participa tanto en la etapa de determinación como en la maduración celular post mitosis (Castro, 2012), jugando un rol esencial en la diferenciación final de los miotubos para su fusión y maduración. Además, este factor preserva la masa muscular esquelética, siendo reconocido como el principal influyente en el fenotipo muscular esquelético (Ropka-Molik *et al.*, 2011). La estructura celular final de un miocito o célula muscular constará de un citoesqueleto compuesto de tres tipos de fibras, microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Los filamentos intermedios se conforman principalmente de una proteína llamada Desmina (DES). Esta proteína juega un importante rol al rodear los microfilamentos a nivel de la banda Z, formando un complejo de conexión tridimensional entre células y membranas nucleares adyacentes (Wojtysiak y Poltowicz, 2015). Una vez completa la diferenciación y especialización miogénica, las células progenitoras entraran en quiescencia como un tipo celular indiferenciado mononuclear denominado célula satélite, la cual se localizará entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras musculares (Schmalbruch y Lewis 2000; Burdzinska, 2008). Por su parte, los miocitos fusionados que conforman a los miotubos

maduros darán paso a la existencia de fibras musculares altamente especializadas (Ruiz, 2014).

### **Diferenciación *in vitro* de MSC como modelo para la miogénesis bovina**

La capacidad de diferenciación celular *in vitro* de las MSC está determinada por la presencia de factores inductores en el medio de cultivo que proporcionan las condiciones y estímulos para permitir la diferenciación y especialización celular miogénica (Cortés *et al.*, 2013). Se ha reportado el uso de diferentes factores de crecimiento, como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como inductores de diferenciación miogénica (Stern-Straeter *et al.*, 2014). Estos factores se reconocen como citoquinas que juegan un rol de promotores de proliferación celular, siendo sus mecanismos de señalización ampliamente estudiados (Turnbull y Rivier, 1999). Sin embargo, su potencial rol como inductores de diferenciación miogénica aún no ha sido completamente establecido (Stern-Straeter *et al.*, 2014). El compuesto 5-Azacitidina (5-Aza) es un análogo nucleotídico que actúa como agente regulador de la expresión genética del DNA mediante una demetilación de tipo pasiva y es considerado también como inductor de diferenciación miogénica (Gómez *et al.*, 2006). Adicionalmente se ha reportado el uso de la citoquina Galectina-1 como factor de diferenciación miogénica en MSC fetales humanas (Chan *et al.*, 2006). Esta citoquina es secretada por mioblastos en cultivo y ha sido asociada a la etapa terminal de la diferenciación miogénica *in vitro* (Goldring *et al.*, 2002). Se ha reportado una eficiente diferenciación miogénica *in vitro* de MSC fetales humanas expuestas a Galectina-1, con expresión de MRF, DES y resultando finalmente en la formación de fibras musculares multinucleadas maduras (Chan *et al.*, 2006). Por su parte, el medio comercial SKGM-2 Bullet kit, compuesto de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, factor de crecimiento epidermal recombinante humano (rhEGF) y dexametasona, se describe como un medio de cultivo comercial con capacidades de inducción miogénica (Stern-Straeter *et al.*, 2014). El aminoácido L-glutamina es la principal fuente de energía en este medio comercial, posibilitando así la proliferación y propagación celular *in vitro* (Eagle, 1955; Castaño y Zapata, 2012). El rhFGF es un polipéptido inductor de división celular de múltiples tipos celulares *in vitro* y su utilización

ha sido reportada ampliamente en distintos protocolos de diferenciación celular (Cortés *et al.*, 2013). Adicionalmente se ha descrito que rhFGF ejerce un fuerte efecto mitogénico en células musculares bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Tehrani *et al.*, 2014). La dexametasona es un glucocorticoide sintético, no metabolizable, que usado en bajas concentraciones induce la expresión temprana de mRNA de MYOD1, MYOG y otras proteínas miogénicas, además de incrementar la expresión de mRNA de MYOD1, MYF5 y MYF6 (Belanto *et al.*, 2010). También se describe que la dexametasona regula la supervivencia, proliferación y diferenciación a partir de la modulación de cascadas de señalización y moléculas de expresión y actúa acelerando la fusión de los miotubos y la diferenciación final de los miocitos (Tehrani *et al.*, 2014). El uso de SKGM-2 Bullet kit se ha estudiado en MSC humanas encontrándose un bajo grado de diferenciación miogénica en MSC derivadas de tejido adiposo e inexistente en MSC derivadas de tejido óseo (Stern-Straeter *et al.*, 2014). Sin embargo, la utilización de este medio en inducción miogénica aún no ha sido reportada en MSC derivadas de especies animales domésticas.

### **Uso de un modelo fetal bovino para la diferenciación miogénica *in vitro* de MSC**

En el presente estudio se propuso la utilización de MSC fetales bovinas como modelo de diferenciación celular miogénica para investigaciones en desarrollo músculo-esquelético (Bucher *et al.*, 2013). En el caso de la producción de carne, éste modelo es de gran utilidad para el estudio de la expresión de genes y proteínas miogénicas que condicionan características específicas de la composición de la carne, tales como el tipo y cantidad de fibras musculares, materia grasa, contenido fibroso y actividad metabólica. En consecuencia, estudios de miogénesis utilizando MSC resultan prometedores para determinar los mecanismos implicados en la miogénesis y el desarrollo muscular, tendientes a mejorar la composición y rendimiento de la carne en especies de abasto (Ruiz, 2014). La diferenciación miogénica *in vitro* de MSC provenientes de feto bovino, constituyen un importante modelo experimental que se asemeja a la miogénesis en el desarrollo embrionario muscular bovino. Las células que constituyen la estructura básica del sistema músculo-esquelético: miocitos, adipocitos y fibroblastos, derivan del mismo pool de MSC en la etapa fetal (Uezumi *et al.*, 2011), por tanto, regular los mecanismos de diferenciación de las MSC resulta esencial para lograr mejoras en la calidad de la canal y en

la eficiencia de la producción cárnica para la industria ganadera. Por otra parte, para el desarrollo de la medicina regenerativa y terapia celular en base a MSC, tanto en medicina humana como veterinaria, es de suma importancia el uso de un modelo experimental apropiado, que permita llevar a cabo estudios que entreguen resultados de alta confiabilidad (Aerssens *et al.*, 1998).

## **HIPÓTESIS**

Las MSC poseen potencial de diferenciación mesodérmico y en particular, capacidad de diferenciación miogénica *in vivo*. En consecuencia, la exposición *in vitro* de MSC derivadas de médula ósea fetal bovina al medio comercial para la diferenciación de mioblastos SKGM-2 Bullet kit, permite inducir su diferenciación hacia un linaje celular miogénico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del medio comercial SKGM-2 Bullet kit como potencial inductor de diferenciación miogénica en MSC bovinas derivadas de médula ósea fetal.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar cambios en la morfología asociados a un perfil miogénico en MSC bovinas derivadas de médula ósea fetal y cultivadas en medio comercial SKGM-2 Bullet kit.
2. Evaluar la expresión génica de los niveles de mRNA de los marcadores músculo-específicos *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MYF6* y *DES* en MSC bovinas derivadas de médula ósea fetal y cultivadas en medio comercial SKGM-2 Bullet kit.
3. Identificar la presencia de los marcadores músculo-específicos MYF5 y DES en MSC bovinas derivadas de médula ósea fetal y cultivadas en medio comercial SKGM-2 Bullet kit.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención y aislamiento de MSC**

Se obtuvo médula ósea desde un feto bovino de siete-ocho meses de gestación, derivado de una planta faenadora y trasladado en un contenedor térmico al Laboratorio de Células Madre del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se procedió a disecar el fémur y posteriormente a seccionar la diáfisis femoral utilizando una sierra estéril. La médula ósea fue aspirada utilizando una jeringa de 10 mL con un medio de colección (DMEM alto en glucosa, Hyclone, Logan, USA). El aspirado de médula fue centrifugado dos veces con PBS (pH 7,4) y dos veces en medio de colección sin heparina a 500 g por cinco minutos. Una vez lavado y centrifugado, el pellet fue suspendido en un medio de colección suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% Anfotericina y 1% Penicilina/Estreptomicina (Hyclone, Logan, USA). Posteriormente el pellet fue sembrado en placas para cultivo celular de 100 mm e incubado a 38° C, bajo una atmósfera humedecida conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de dos días, las células no adheridas fueron extraídas mediante cambio de medio. Para los experimentos de diferenciación se utilizaron células de 3er y 4to pasaje. El pasaje de las MSC fue realizado mediante remoción con tripsina al 50% por 10 minutos a 38° C. Las MSC fueron contadas a través de una cámara de Neubauer utilizando tinción de azul de tripan.

### **Cultivo y diferenciación de MSC *in vitro***

Aproximadamente  $3,5 \times 10^3$  células/mL, equivalente a 210.000 células totales fueron sembradas en medio control, consistente en DMEM alto en glucosa suplementado con 10% SFB, 1% Anfotericina y 1% Penicilina o en medio comercial SKGM-2 Bullet kit (Lonza, Walkersville, USA), cuya formulación consiste en un medio base SKBM suplementado con 10% SFB, Dexametasona, L-Glutamina, rhEGF, Gentamicina y Anfotericina-B. La formulación exacta del medio SKBM no está disponible ya que solo es conocida por el fabricante. Las MSC en medio control y diferenciación fueron cultivadas por 21 días a 38° C, bajo atmosfera humedecida con 5% CO<sub>2</sub>. Se obtuvieron muestras (aproximadamente  $5 \times 10^5$  células) de cada tratamiento los días 0, 7, 14 y 21 y se fijaron en buffer RLT

(QIAGEN Inc., CA, USA) con 5  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para su análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativo (Q-PCR). Previo a fijar las muestras, se tomaron fotografías a través de microscopía óptica para un estudio citológico celular de tipo cualitativo, en el cual se evaluaron cambios de morfología, disposición y cantidad de células. Adicionalmente se obtuvieron muestras de tres repeticiones de los días 0 y 21 de cada tratamiento para análisis cualitativo de marcadores músculo-específicos mediante microscopía de epifluorescencia.

### **PCR cuantitativo (Q-PCR)**

La cuantificación de los niveles de mRNA de genes de linaje miogénico *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MYF6* y *DES* fue determinada en el laboratorio de reproducción animal mediante Q-PCR (Tabla 1). Inicialmente fueron cuantificados los niveles de mRNA de estos genes en muestras de músculo fetal y muestras de MSC indiferenciadas, evaluando así la expresión de los genes endógenos *ACTINA* y *GADPH*. El ARN total se cuantificó utilizando un Qubit 2.0 (Fluorometer, CA, USA). El cDNA se sintetizó y amplificó mediante un kit Affinity Script Q-PCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, CA, USA), utilizando un termociclador Step One (Applied Biosystems, CA, USA). La reacción de PCR se realizó utilizando un kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, CA, USA) y un termociclador Eco REAL-TIME PCR SYSTEM (Illumina, CA, USA). Cada tubo de reacción contuvo: 5  $\mu$ L de Sybr Green, 1  $\mu$ L de primer Forward, 1  $\mu$ L de primer Reverse, 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 5 ng de cDNA. La expresión relativa de los marcadores miogénicos se calculó en relación a la expresión del gen endógeno  $\beta$ -Actina utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$  ( $C_t$ : Threshold Value) (Vandesompele *et al.*, 2002).

## **Inmunofluorescencia**

Las MSC cultivadas en los medios de diferenciación y control se fijaron con 2% paraformaldehído por 20 min, luego se lavaron con PBS por cinco minutos y se permeabilizaron con 0.2% de Tritón X-100 por cinco minutos. Posteriormente, las MSC se incubaron en una solución de bloqueo consistente en suero de burro al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) por 30 minutos a 37° C. Luego, las MSC se incubaron durante toda la noche a 4° C en anticuerpos policlonales de cabra Anti-DES o Anti-MYF5 (Cat.# SC-7559 y Cat.# SC-31946, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), en una solución de suero de burro más Buffer Fosfato Salino (PBS) en una dilución de 1:50. Al día siguiente, las MSC fueron lavadas con PBS por cinco minutos e incubadas con anticuerpo secundario IgG anti-cabra ligado a FITC (Santa Cruz Biotechnology) en una solución de suero de burro más PBS en una dilución de 1:100 por 30 minutos. A continuación, las MSC fueron nuevamente lavadas con PBS por cinco minutos y montadas en medio de montaje con tinción 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; Vectastain, Vector Laboratories, Ontario, Canadá) para visualización de núcleos celulares por cinco minutos. Finalmente fueron lavadas con PBS por cinco minutos. Una vez finalizado el protocolo, las muestras fueron guardadas a 4° C protegidas de la luz. Las muestras se fotografiaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus, Tokio, Japón) y una cámara fotográfica conectada a un computador.

## **Análisis estadístico**

Los valores de expresión relativa de genes, obtenidos desde tres repeticiones, fueron expresados como media y desviación estándar. El modelo estadístico consideró como variable dependiente la expresión relativa de genes, mientras que las variables independientes fueron días en cultivo, tratamiento y la interacción entre ambas variables. Se utilizó un valor de significancia de  $P < 0.05$ . La prueba de Shapiro Wilks fue utilizada para evaluar la distribución normal de los datos. Los niveles de mRNA de los genes miogénicos *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MYF6* y *DES* se analizaron estadísticamente por ANOVA de una vía. Las diferencias entre promedios para días de cultivo y tratamientos se determinaron

utilizando el post Test de Duncan. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Info Stat (Córdoba, Argentina, 2014).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de partidores utilizados para análisis de Q-PCR

GEN		SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS (5'-3')	N° ACCESO
<i>MYOD1</i>	Forward	CGA CTC GGA CGC TTC CAG T	NM_001040478.2
	Reverse	GAT GCT GGA CAG GCA GTC GA	
<i>MYF5</i>	Forward	CAG GAA TGC CAT CCG CTA CA	NM_174116.1
	Reverse	GGC AAT CCA GGT TGC TCT GA	
<i>MYF6</i>	Forward	GGT GGA CCC CTT CAG CTA CAG	NM_181811.1
	Reverse	GGT GGA CCC CTT CAG CTA CAG	
<i>MYOG</i>	Forward	GTG CCC AGT GAA TGC AGC TC	NM_001111325.1
	Reverse	GTC TGT AGG GTC CGC TGG GA	
<i>DES</i>	Forward	GGA CCT GCT CAA TGT CAA GA	NM_001081575.1
	Reverse	GGA AGT TGA GGG CAG AGA AG	
<i>GADPH</i>	Forward	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	NM_001034034.2
	Reverse	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	
<i>β-ACTINA</i>	Forward	CGCACCACTGGCATTGTCAT	NM_001033618.1
	Reverse	TCCAAGGCGACGTAGCAGAG	

## RESULTADOS

### **Análisis morfológico de MSC durante diferenciación miogénica *in vitro***

La morfología típica presentada por estas células se caracteriza por ser de tipo fibroblastoide, la cual se mantuvo durante la expansión de los cultivos y los primeros días de diferenciación tanto para el tratamiento con SKGM-2 Bullet kit como para el control (Figura 1). Durante el periodo inicial de diferenciación, se observó un aumento en el

número de células adheridas al plástico, lo que se asoció a un aumento en la proliferación celular en comparación al grupo de células control. Por otra parte, la morfología de las células en diferenciación fue cambiando hacia el final del período de cultivo, adquiriendo una forma elongada y disposición lineal dando un aspecto de líneas paralelas convergentes, además de exhibir un aspecto celular tridimensional. En comparación, las células control mantuvieron su aspecto inicial de tipo fibroblastoide.

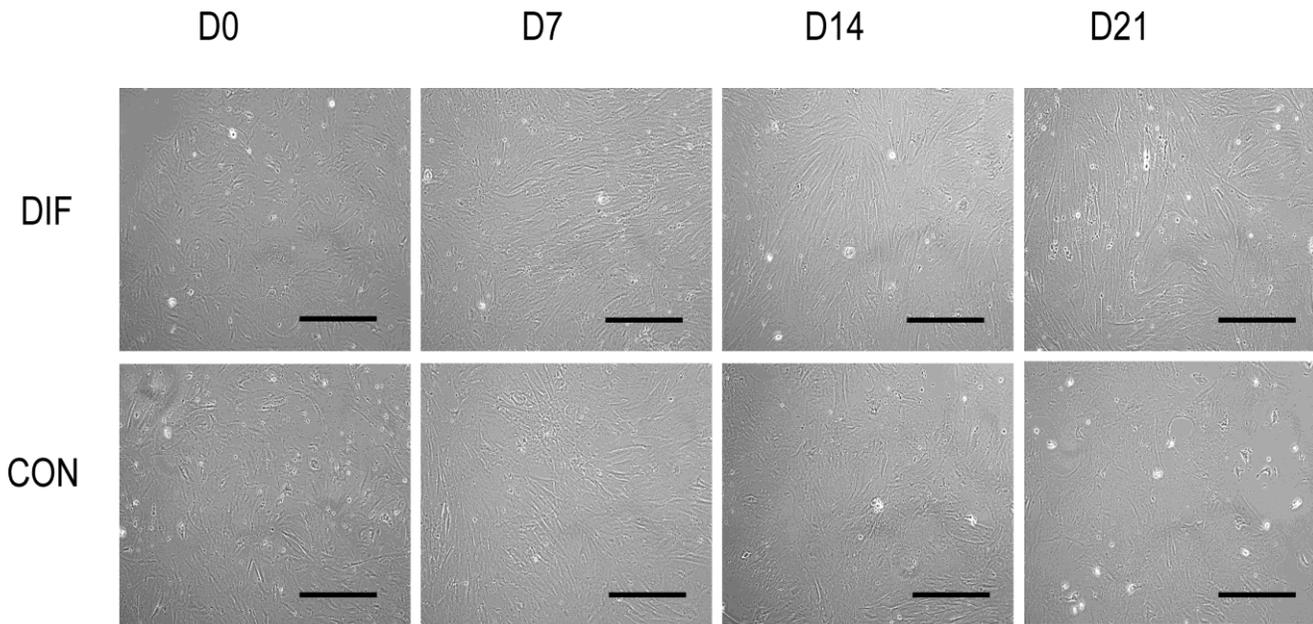


Figura 1. Microfotografías de MSC de médula ósea fetal bovina durante 21 días de cultivo en medio SKGM-2 Bullet kit de diferenciación miogénica y medio control. MSC de día 0 en cultivo poseen una morfología típica fibroblastoide (A y B). Las MSC de diferenciación fueron cambiando su morfología, adquiriendo una disposición lineal hacia el final del período de cultivo (D, F y H). En comparación, las células control mantuvieron su aspecto inicial de tipo fibroblastoide (C, E y G). Barra de Escala: 500  $\mu$ m.

## Análisis de Q-PCR para genes miogénicos

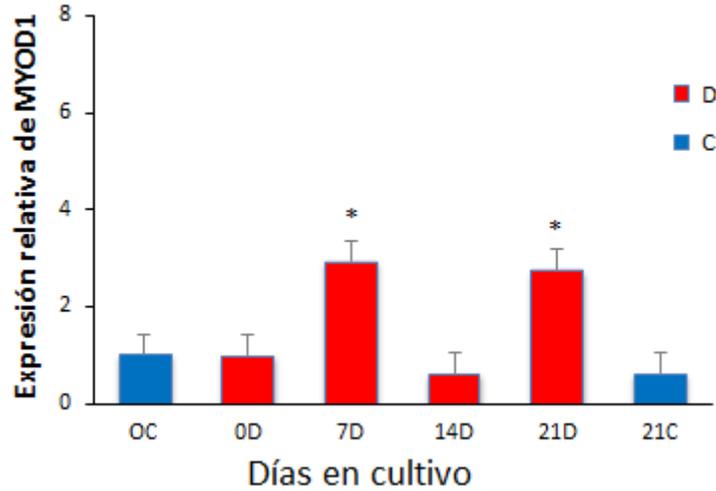
El proceso de diferenciación miogénica fue evaluado mediante la cuantificación de los niveles de mRNA de los genes miogénicos *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MYF6* y *DES*. El Q-PCR para la muestra de músculo fetal detectó amplificación de mRNA de *MYOD1*, *MYOG* y *DES* pero ausencia de niveles de mRNA de *MYF5* y *MYF6* (Tabla 2). En contraste, se detectó presencia de mRNA de todos los genes miogénicos analizados en las muestras de MSC indiferenciadas.

Tabla 2. Valores de Ct de mRNA de genes miogénicos y genes endógenos ACTINA y GAPDH en músculo fetal y MSC bovinas en día 0 de cultivo (MSC D0).

GEN	MSC D0	MÚSCULO FETAL
<i>MYOD1</i>	35,23	34,37
<i>MYF5</i>	24,65	-
<i>MYOG</i>	34,84	33,28
<i>MYF6</i>	28,47	-
<i>DES</i>	21,69	31,08
<i>β-ACTINA</i>	14,1	26,25
<i>GADPH</i>	15,76	32,95

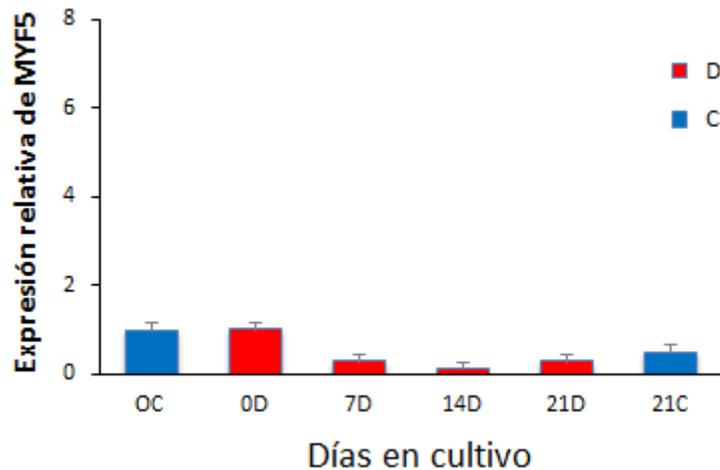
(-) Indica que no se obtuvo amplificación de mRNA luego de 35 ciclos.

Las muestras de cultivos celulares fueron obtenidas los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo para los tratamientos de diferenciación miogénica y los días 0 y 21 de cultivo para el control. La expresión de mRNA de *MYOD1* aumentó significativamente los días 7 y 21 en cultivo en relación al día 0 (2,9 y 2,7 veces la expresión del día 0;  $P < 0,05$ ) (Figura 3).



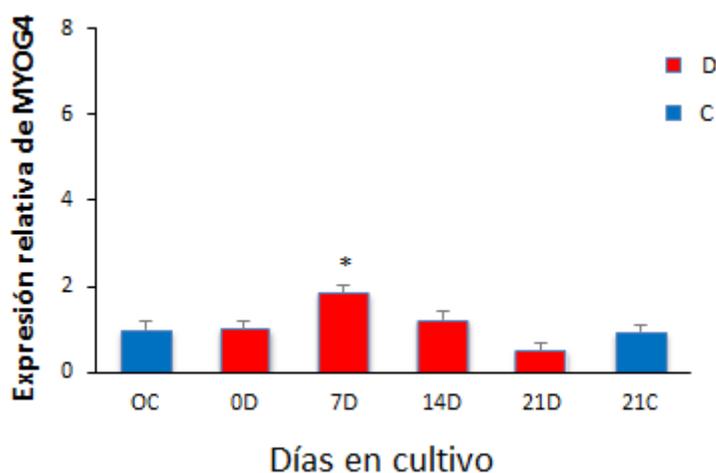
**Figura 3.** Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de *MYOD1* en MSC expuestas a diferenciación miogénica durante 21 días de cultivo en medio SKGM-2 Bullet kit. La expresión de mRNA de *MYOD1* aumentó los días 7 y 21 en relación al día 0. (\*) Indica diferencias entre día de diferenciación y día 0 ( $P < 0,05$ ). Abreviación: C= cultivo control y D= cultivo diferenciación.

Por su parte, la expresión de mRNA de *MYF5* no fue distinta los días 7, 14 y 21 de cultivo en relación al día 0 (0,3, 0,2 y 0,3 veces la expresión del día 0;  $P > 0,05$ ) (Figura 4).



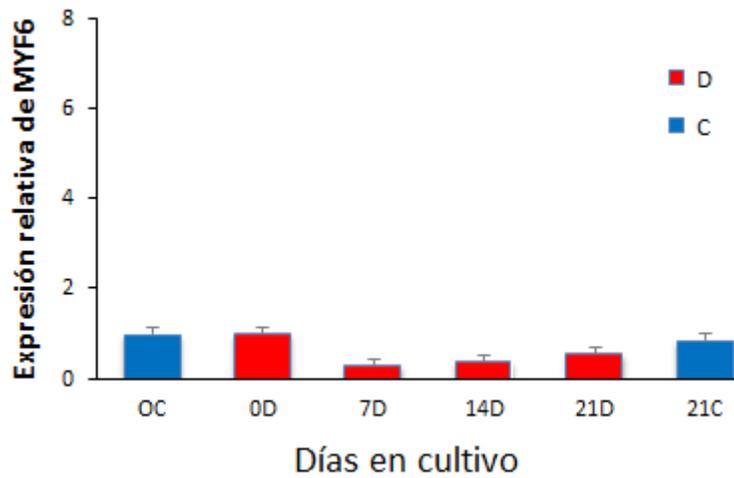
**Figura 4.** Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de *MYF5* en MSC expuestas a diferenciación miogénica durante 21 días de cultivo en medio SKGM-2 Bullet kit. La expresión de mRNA de *MYF5* no fue distinta los días 7, 14 y 21 en relación al día 0 ( $P < 0,05$ ). Abreviación: C= grupo control y D= grupo diferenciación.

En comparación con *MYF5*, la expresión relativa de mRNA de *MYOG* en MSC aumentó ( $P < 0,05$ ) los días 7 y 14 en cultivo en relación al día 0 (1.8 y 1.2 veces la expresión del día 0) (Figura 5).



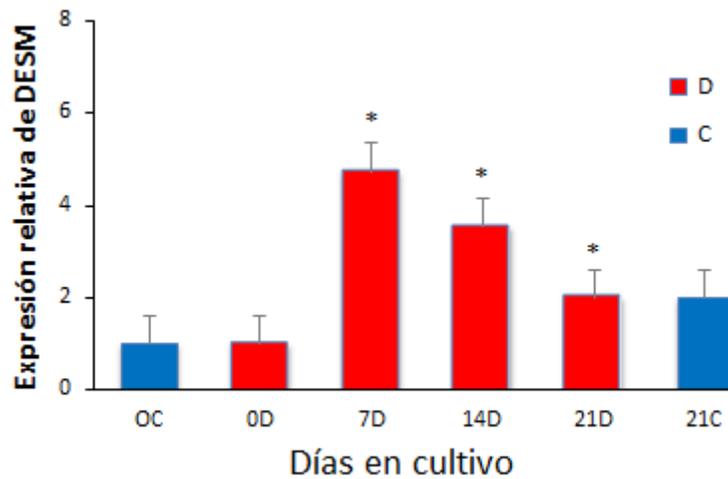
**Figura 5.** Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de *MYOG* en MSC expuestas a diferenciación miogénica durante 21 días de cultivo en medio SKGM-2 Bullet kit. La expresión de mRNA de *MYOG* aumentó los días 7 y 14 en relación al día 0 ( $P < 0,05$ ). (\*) Indica diferencias entre día de diferenciación y día 0 ( $P < 0,05$ ). Abreviación: C= grupo control y D= grupo diferenciación.

En forma similar a los valores obtenidos para *MYF5*, La expresión relativa de mRNA de *MYF6* no mostró diferencia significativa para los días 7, 14 y 21 de cultivo en relación al día 0 (0.3; 0,4 y 0,5 veces la expresión del día 0;  $P > 0,05$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de *MYF6* en MSC expuestas a diferenciación miogénica durante 21 días de cultivo en medio SKGM-2 Bullet kit. La expresión de mRNA de *MYF6* no fue distinta los días 7, 14 y 21 en relación al día 0. Abreviación: C= grupo control y D= grupo diferenciación

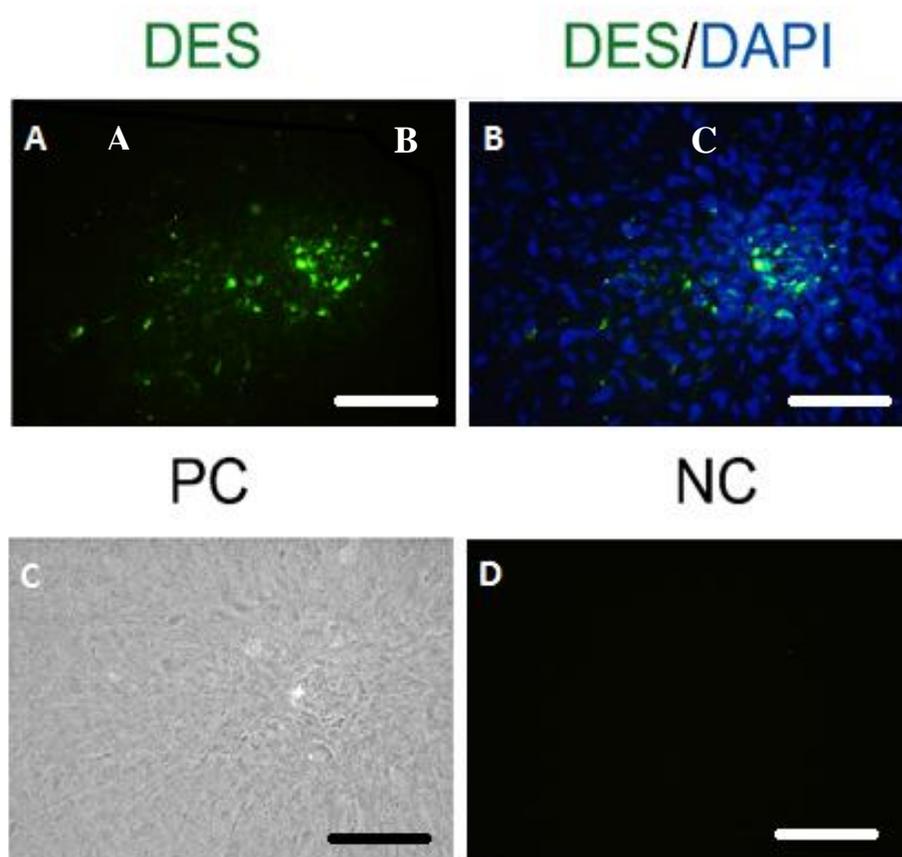
Finalmente, la expresión relativa de mRNA de *DES*, un marcador músculo-específico, aumentó ( $P < 0,05$ ) los días 7, 14 y 21 en cultivo en relación al día 0. (4,7; 3,5 y 2 veces la expresión del día 0) (Figura 7).



**Figura 7.** Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de *DES* en MSC expuestas a diferenciación miogénica durante 21 días de cultivo en medio SKGM-2 Bullet kit. La expresión de mRNA de *DES* aumentó significativamente los días 7, 14 y 21 en relación al día 0. (\*) Indica diferencias entre días de diferenciación y día 0 ( $P < 0,05$ ). Abreviación: C= grupo control y D= grupo diferenciación.

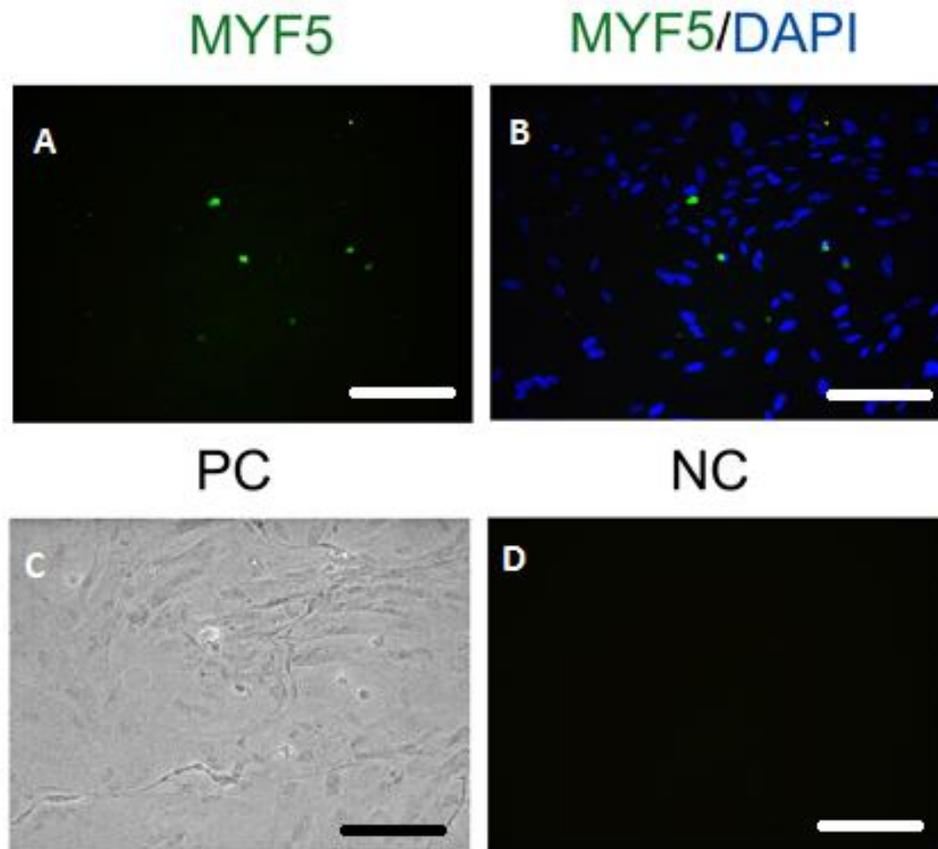
## Inmunofluorescencia

Las proteínas MYF5 y DES fueron inmunodetectadas en cultivos de MSC el día 21 de diferenciación. Se observó un patrón de fluorescencia asociada a DES en agregados celulares de MSC diferenciadas. La detección de núcleos celulares se realizó mediante tinción DAPI. Para el control negativo se utilizaron MSC control de día 21, las cuales resultaron negativas a inmunodetección de DES (Figura 7).



**Figura 7** Inmunofluorescencia indirecta asociada a DES en MSC tratadas con medio SKGM-2 Bullet kit. A) Microfotografía de inmunofluorescencia asociada a DES en MSC; B) Superposición de tinción DAPI con inmunofluorescencia asociada a DES en MSC; C) Microfotografía de contraste de fase. D) Control Negativo. Barra de escala= 200 um.

En comparación, la inmunoreactividad asociada a MYF5 fue detectada en subpoblaciones de MSC diferenciadas. La tinción de núcleos celulares se realizó utilizando tinción DAPI. Para el control negativo se utilizaron MSC control de día 21, las cuales resultaron negativas a inmunodetección de MYF5 (Figura 8).



**Figura 8.** Inmunofluorescencia indirecta asociada a MYF5 en MSC tratadas con medio SKGM-2 Bullet kit. A) Microfotografía de inmunofluorescencia asociada a MYF5 en MSC; B) Superposición de tinción DAPI con inmunofluorescencia asociada a MYF5 en MSC; C) Microfotografía de contraste de fase. D) Control Negativo. Barra de escala= 200 um.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el potencial de diferenciación miogénica *in vitro* de MSC provenientes de médula ósea fetal bovina. Mediante microscopía de contraste de fases se pudo observar la morfología de la población celular proveniente de médula ósea con adherencia al plástico, la cual se caracterizó por poseer una morfología de tipo fibroblastoide, como ha sido descrita previamente en la literatura para varias fuentes de MSC (Bosnakovski *et al.*, 2005). Una vez realizado el aislamiento, los cultivos de MSC fueron expuestos al medio comercial para cultivo de mioblastos SKGM-2 Bullet kit, con el objetivo de evaluar el potencial de diferenciación miogénica de las MSC fetales bovinas. Este proceso de diferenciación fue evaluado mediante cuantificación de los niveles de mRNA de reguladores miogénicos *MYOD1*, *MYF5*, *MYOG*, *MYF6* y *DES* y mediante inmunodetección de marcadores de miocitos DES y de mioblastos MYF5.

La utilización de MSC para el estudio de diferenciación miogénica ha sido previamente descrita en ensayos de MSC de origen humano (Chan *et al.*, 2006) y/o murino (Nakatsuka *et al.*, 2010). En el presente estudio, se utilizó un protocolo de diferenciación miogénica descrito previamente para MSC humanas de origen óseo y adiposo (Stern-Straeter *et al.*, 2014). Con este fin, se evaluó la morfología celular de las MSC mediante microscopía, donde se registró un cambio morfológico desde el tipo fibroblastoide a una disposición lineal hacia el final del período de cultivo. Otros ensayos han reportado morfología similar en MSC humanas fetales (Chan, *et al.*, 2006) y adultas (Gornostaeva *et al.*, 2006) expuestas a distintos medios de diferenciación miogénica. Sin embargo, en dichos estudios se describe además la presencia de células multinucleadas y elongadas, con apariencia de fibras que se estrechan en una dirección, se fusionan y forman túbulos multinucleados, las que no fueron encontradas en este estudio. Esta diferencia de morfología obtenida, en comparación a las encontradas en otros estudios, puede deberse a características propias de las MSC, así como a la utilización de un medio distinto de diferenciación miogénica. Así mismo, la ausencia de células multinucleadas indica que no se produjo el proceso de fusión celular, lo cual puede deberse a la ausencia de algún factor intrínseco no expresado en las células o a la necesidad de un periodo de diferenciación más prolongado.

Los genes evaluados fueron seleccionados con el objetivo de determinar niveles de mRNA de MRF de expresión temprana (*MYOD1* y *MYF5*) y tardía (*MYOG* y *MYF6*) durante el proceso de miogénesis. La expresión relativa del gen *MYOD1* aumentó en MSC luego de 7 días de cultivo en medio de diferenciación SKGM-2 Bullet kit. En contraste, la expresión relativa de *MYF5* no fue diferente en MSC expuestas al medio de diferenciación SKGM-2 Bullet kit, durante el proceso de diferenciación. Se ha descrito en la literatura, que la función de los genes determinantes *MYOD1* y *MYF5* puede ser mutuamente compensada durante la miogénesis (Berkes y Tapscott, 2005). Esto significa que se requiere la presencia de uno de estos genes para la activación del proceso, lo cual sugiere que las MSC cultivadas en medio inductor miogénico regularon de manera distinta la expresión de genes determinantes. *MYOG* es un gen que se presenta posterior a la expresión de los genes determinantes y su función principal es la de ser un factor de diferenciación en el proceso miogénico induciendo la formación de un fenotipo muscular terminal (Singh y Dilworth, 2013). La expresión de *MYOG* aumentó para las MSC bovinas cultivadas con el medio de diferenciación SKGM-2 Bullet kit, del mismo modo como ocurrió en el estudio de diferenciación miogénica de MSC humanas fetales en cultivo bajo Galectin-1 (Chan *et al.*, 2006). Esto sugiere que las MSC iniciaron un proceso de diferenciación inicial hacia un estado de mioblasto temprano. *MYF6* es el MRF que se expresa en la etapa terminal de diferenciación, siendo partícipe de la maduración final de los miocitos en cultivo (Ropka-Molik *et al.*, 2011). En este estudio, la expresión temprana de *MYF6* en células de día 21 de diferenciación no fue distinta a su día 0. En base a lo descrito en la literatura, respecto a la expresión tardía de este gen, se podría especular que su expresión pudiese ser más tardía y aumentar en cultivos con un mayor tiempo de diferenciación. Cabe destacar que *MYF6* tiene la facultad de actuar tanto como factor determinador como diferenciador en la miogénesis (Singh y Dilworth, 2013). Sin embargo, su bajo nivel de expresión en presencia de otros MRF, no implica la ausencia de diferenciación miogénica en las células bajo tratamiento. Estudios confirman que sólo se necesita de la expresión de dos de los cuatro factores músculo-específicos, un determinante y otro diferenciador para lograr el desarrollo normal de una musculatura funcional (Singh y Dilworth, 2013). En el presente estudio se detectó un aumento en la expresión de *MYOD1* y de *MYOG*, lo que sugiere la activación de

los procesos de determinación y diferenciación de MSC hacia el linaje miogénico. Sin embargo, la baja expresión del gen diferenciador *MYF6* podría explicar la ausencia de fusión celular, debido a que su participación es esencial para la etapa final de diferenciación, fusión y maduración de los miotúbulos. Por lo tanto, se puede inferir que las MSC fetales bovinas alcanzaron un estado de diferenciación miogénica intermedio, avanzando en los procesos de determinación y diferenciación inicial hasta alcanzar un estado de mioblasto temprano. A pesar de esto, las células no alcanzaron una fase de diferenciación final caracterizada por la formación de miocitos maduros.

Adicionalmente se cuantificó la expresión de mRNA de *DES*, un gen músculo-específico expresado en mioblastos en formación que codifica para filamentos intermedios del citoesqueleto (Wojtysiak y Poltowicz, 2015). Se detectó un aumento significativo de la expresión de mRNA de *DES* en células en cultivo los días 7, 14 y 21 de diferenciación. Este patrón de expresión concuerda con resultados publicados previamente, en los cuales se determinó una alta expresión de los niveles de mRNA de *DES* en MSC de endometrio suplementadas con glucocorticoides, en una formulación similar al SKGM-2 Bullet kit (Tehrani *et al.*, 2014). Se ha descrito previamente en la literatura que los glucocorticoides ejercen una gran variedad de efectos sobre la diferenciación de mioblastos en cultivo, siendo la dexametasona el principal inductor de fusión de los miotubos y, por lo tanto, de diferenciación final de los miocitos (Belanto *et al.*, 2010; Tehrani *et al.*, 2014). Por su parte, los resultados de la inmunofluorescencia asociada a los marcadores de linaje miogénico MYF5 y DES detectados en este estudio, resultaron congruentes para la detección de MYF5, no así para DES, en relación a otro estudio de diferenciación miogénica en MSC humanas derivadas de médula ósea cultivadas en medio SKGM-2 Bullet kit. (Stern-Straeter, *et al.*, 2014). Esta variación puede deberse a diferencias en la expresión de marcadores entre MSC humanas y bovinas, a la utilización de técnicas de inmunofluorescencia o protocolos de cultivo distintos.

Según los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que los genes músculo-específicos analizados en las MSC fetales bovinas en medio de diferenciación SKGM-2 Bullet kit resultaron en general con baja expresión. Sin embargo, sólo *MYOD1*, *MYOG* y

*DES* aumentaron su expresión en forma significativa durante la diferenciación miogénica. A su vez, el análisis de la expresión de mRNA realizados para músculo fetal, presentaron un patrón de expresión génica similar para los MRF en comparación a las MSC indiferenciadas. Esto debido a que *MYF5* y *MYF6* no fueron detectadas en músculo fetal y no aumentaron su expresión en MSC indiferenciadas. Por otra parte, los patrones de inmunofluorescencia de MYF5 y DES detectados en las MSC fetales bovinas fueron asociados a su expresión relativa de mRNA en cultivo.

En conclusión, las MSC fetales bovinas expuestas al medio SKGM-2 Bullet kit, avanzaron hacia un estado intermedio o tardío de diferenciación miogénica, posiblemente caracterizado por la presencia de mioblastos tempranos. Estos resultados sugieren que las MSC fetales bovinas poseen un potencial limitado de diferenciación miogénica *in vitro*, o que la exposición al medio SKGM-2 Bullet kit no fue suficiente para inducir un efecto de diferenciación terminal.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, principalmente a mis padres, quienes fueron esenciales para este periodo de aprendizaje académico y crecimiento personal, entregándome todo su apoyo incondicional para superar cada obstáculo o desafío que se presentó, e inculcando en mí la perseverancia necesaria para lograr mis metas exitosamente.

Al doctor Oscar Peralta, mi profesor guía quien fue la base para llevar a cabo este proyecto, brindándome herramientas de ayuda, apoyo y enseñanzas, agradezco la oportunidad de haber formado parte de su equipo de investigación.

A mis profesores correctores, doctora Mónica de los Reyes y doctor Víctor Parraguez quienes fueron de gran ayuda para la realización de este proyecto, agradezco sus consejos y guía para el término de esta memoria.

A todo el Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Veterinaria y Ciencias Pecuarias de la Universidad de Chile, quienes pusieron a disposición todas las herramientas necesarias para llevar a cabo los estudios de laboratorio.

Al doctor Fabrizio Cuevas, sus recomendaciones, guía y apoyo sirvieron de gran ayuda para la realización de esta memoria.

Finalmente a mis compañeros de carrera, de los cuales muchos se convirtieron en excelentes amigos incondicionales, compañía para cada jornada de estudio, proyectos, trabajos y prácticos.

## BIBLIOGRAFÍA

**AERSSSENS, J.; BOONEN, S.; LOWET, G.; DEQUEKER, J.** 1998. Interspecies differences in bone composition density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663-670.

**AUGELLO, A.; KURTH, T.; DE BARI, C.** 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cell. Mater.* 20:121-133.

**BANAS, A.; YAMAMOTO, Y.; TERATANI, T.; OCHIYA, T.** 2007. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev. Dyn.* 236:3228-3241.

**BELANTO, J.; DIAZ-PEREZ, S.; MAGYAR, C.; MAXWELL, M.; YILMAZ, Y.; TOPP, K.; BOSO, G.; JAMIESON, C.; CACALANO, N.; JAMIESON, C.** 2010. Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. *Neuromuscul. Disord.* 20:111-121.

**BERKES, C.; TAPSCOTT, S.** 2005. MyoD and the transcriptional control of miogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16:585-589.

**BOSNAKOVSKI, D.; MIZUMO, 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.

**BUCHER, C.; GAZDHAR, A. BENNEKER, L.; GEISER, T.; GANTENBEIN-RITTER, B.** 2013. Nonviral gene delivery of growth and differentiation factor 5 to human mesenchymal stem cells injected into a 3D bovine intervertebral disc organ culture system. *Stem Cells Int.* 32:1-9.

**BURDZINSKA, A.; GALA, K.; PACZEK, L.** 2008. Myogenic stem cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 46:401-412.

**CAPLAN, AL.; BRUDER, SP.** 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends. Mol. Med.* 7:259-264.

**CASTAÑO, M.; ZAPATA, J.** 2012. Cultivos celulares. *Principios de Virología.* Ed. Biogenesis. Medellín, Colombia. pp. 50-64.

**CASTRO, N.** 2012. Miogénesis craneofacial y cardíaca: una revisión de mecanismos moleculares y celulares paralelos. *Acta. Odontol. Colombia.* 2: 179-190.

**CHAN, J.; O'DONOGHUE, K.; GAVINA, M.; TORRENTE, Y.; KENNEA, N.; MEHMET, H.; STEWART, H.; WATT, DJ.; MORGAN, JE.; FISK, NM.** 2006.

Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells* 24:1879-1891.

**CHARGE, S. RUDNICKI, M.** 2004. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.* 84:209-238.

**CORTÉS, Y.; OJEDA, M.; ARAYA, D.; DUEÑAS, F.; FERNÁNDEZ, M.; PERALTA, O.** 2013. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC. Vet. Res.* 9:1-10.

**DÍAZ, P.; CUEVAS, F.; PERALTA, O.** 2014. GFP labelling and epigenetic enzyme expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from bovine foetuses. *Res. Vet. Sci.* 99:120-128.

**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.

**EAGLE, H.** 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122:501-514.

**FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S.** 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell. Tissue. Kinet.* 3:393-403.

**GÓMEZ, L.; PAEZ, M.; ANAYA, J.** 2006. Epigenética y epigenómica de la artritis reumatoide. *Rev. Med.* 14:48-60.

**GOLDRING, K.; JONES, G.; THIAGARAJAH, R.; WATT, D.** 2002. THE EFFECT OF Galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J. Cell. Sci.* 115:355-366.

**GORNOSTAEVA, S.; RZHANINOVA, A.; GOL`DSTEIN, D.** 2006. Myogenesis in hemopoietic tissue mesenchymal stem cell culture. *Bull. Exp. Biol. Med.* 141:493-499.

**LE GRAND, F.; RUDNICKI, A.** 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 19:628-633.

**LEE, K.; KUO, T.; WHANG-PENG, J.; CHUNG, Y.; LIN, C.; CHOU, S.; CHEN, J.; CHEN, Y.; LEE, O.** 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40:1275-1284.

**NAKATSUKA, R.; NOZAKI, T.; UEMURA, Y.; MATSUOKA, Y.; SASAKI, Y.; SHINOHARA, M.; OHURA, K.; SONODA, Y.** 2010. 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment

induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol.* 55:350-357.

**NIE, Y.; DING, X.; GE, X.; FAN, H.; LIU, Z.; GOU, H.** 2013. Enhanced expression of MYF5 and MYOD1 in fibroblast cells via the forced expression of *Bos Taurus* MYF5. *Cell. Biol. Int.* 37:972-976.

**PARKER, M.; SEALE, P.; RUDNICKY, M.** 2003. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 4:497-507.

**PITTINGER, 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.

**PROCKOP, D.** 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.

**ROPKA-MOLIK, K.; ECKERT, R.; PIORKOWSKA, K.** 2011. The expression pattern of myogenic regulatory factors MyoD, Myf6 and Pax7 in postnatal porcine skeletal muscles. *Gene. Expr. Patterns.* 11:79-83.

**RUIZ, L.** 2014. Puesta a punto de la cuantificación mediante PCR a tiempo real de la expresión génica de marcadores miogénicos. Master Universitario en Biotecnología. Universidad Pública de Navarra. 37p.

**SAFFORD, K.; HICOK, K.; SAFFORD, S.; HALVORSEN, Y.; WILKISON, W.; GIMBLE, J.; RICE, H.** 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:371-379.

**SAMBASIVAN, R.; TAJBAKHSI, S.** 2007. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18:870-882.

**SALEM, H.; THIEMERMANN, C.** 2010. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* 28:585-596.

**SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D.** 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23:617-626.

**SHIBATA, M.; MATSUMOTO, K.; AIKAWA, K.; MARUMOTO, T.; FUJIMURA, S.; KADOWAKI, M.** 2006. Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle. *J. Anim. Sci.* 84:2983-2989.

**SINGH, K.; DILWORTH, F.** 2013. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS. Journal.* 280:3991-4003.

**STERN-STRAETER, J.; BONATERRA, GA.; JURITZ, S.; BIRK, R.; GOESSLER, UR.; BIEBACK, K.; BUGERT, P.; SCHULTZ, J.; HORMANN, K.; KINSCHERF, R.; FABER, A.** 2014. Evaluation of the effects of different culture media on the myogenic differentiation potential of adipose tissue- or bone marrow- derived human mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* 33:160-170.

**TEHRANI, H.; PARIVAR, K.; AI, J.; KAJBAFZADEH, A.; RAHBARGHAZI, R.; HASHEMI, M.; SADEGHIZADEH, M.** 2014. Effect of dexamethasone, insulin and EGF on the myogenic potential on human endometrial stem cells. *Iran. J. Pharm. Res.* 13:659-664.

**TURNBULL, A.; RIVIER, C.** 1999. Regulation of the Hypothalamic Pituitary-Adrenal axis by cytokines: Actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79:1-71

**UEZUMI, A.; ITO, T.; MORIJKAWA, D.; SHIMIZU, N.; YONEDA, T.; SEGAWA, M.; YAMAGUCHI, M.; OGAWA, R.; MATEY, MM.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; TSUJIKAWA, K.; TSUCHIDA, K.; YAMAMOTO, H.; FUKADA, S.** 2011. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell. Sci.* 124:3654-3664.

**VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.;** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome. Biol.* 3:1-12.

**WOODBURY, D. SCHWARZ, E.; PROCKOP, D.; BLACK, I.** 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61:364-370.

**WOJTYSIAK, D.; POLTOWICZ, K.** 2015. Effect of ageing time on microstructure, rate of Desmin degradation and meat quality of Pig Longissimus Lumborum and Adductor muscles. *Folia. Biol. (Kraków).* 63:151-158.