

UCH-FC  
DOC-BMCN  
S. 586  
C. 1

**FACTORES DERIVADOS DEL TEJIDO MUSCULAR DAÑADO  
INDUCEN DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA EN  
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS**

Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencia

Facultad de Ciencias

por

**Lorena Santa María Vásquez**

Noviembre, 2005

Director de Tesis: Dr. José J. Minguell Uribe

Co-Director de Tesis: Dra. Cecilia Rojas Beachler



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Lorena Santa María Vásquez

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de Septiembre del 2005.

*Director de Tesis:*

Dr. José J. Minguell U.

*Co-Director de Tesis:*

Dra. Cecilia Rojas B.

*Comisión Evaluadora de la Tesis*

Dr. Miguel Allende

Dra. María Rosa Bono

  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  


*“Pedid y se os dará; buscad y hallareis; llamad y se os abrirá.”*

Mateo 7:7



A mis "vidas" Alexis, Javi y pirigüín.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José J. Minguell por aceptar tutorear una tesis de doctorado más en su larga carrera, aceptar mis ideas por sobre lo que él hubiese deseado que hiciese y finalmente apoyarme para sacarlas adelante.

Muy especialmente agradezco con cariño a la Dra. Cecilia Rojas por su constante preocupación, por haber estado siempre dispuesta a discutir y aconsejar, por su ejemplo de dedicación y rigurosidad en el trabajo, porque sin su apoyo nada de esto hubiese ocurrido.

Al Dr. Walter Sierralta por la confianza entregada en el uso eterno de su microscopio.

A Valeska Simmons por la disposición que siempre tuvo para ayudarme y enseñarme en los experimentos de citometría de flujo y esos entretenidos momentos de trabajo y relajo.

Al Dr. Enrique Jaimovich, Cesar Cárdenas y Marcelo López por las “donaciones” que contribuyeron enormemente en mi tesis. A Juan C. Cassar y Dr. Enrique Brandan por enseñarme su modelo de daño muscular químico.

A Nibaldo por su amabilidad y ayuda gratuita en el trabajo con las ratitas.

A todas las chicas del grupo de “brujas” Mireya, Miriam, Bárbara, Mónica, Jessi y a la distancia Lucía por la amistad incondicional, apoyo, consejos de todo tipo y esos alegres momentos de relajo y diversión. También agradezco a las “brujas mayores” María Angélica y Bianca por su amistad, respaldo y sabios consejos. A los amigos de siempre y por siempre Lorena, Pablo y Christian.

Y en especial agradezco con todo mi amor el apoyo (Beca “Alexis Pinto”), cariño y paciencia de quienes dedico esta Tesis.

## FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta Tesis de Doctorado fue posible gracias al apoyo otorgado por:

- ❖ Beca CONICYT para estudiantes de Doctorado.
- ❖ Beca Dr. Abraham Stekel, INTA, Universidad de Chile.
- ❖ Becas Parciales de Tesis de Postgrado n° PG/58/2002 y n° PG/30/2003, Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.
- ❖ Proyectos FONCECYT N° 1010566 y N° 1040877.



## INDICE DE MATERIAS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Financiamiento.....	iv
Índice de Materias.....	v
Índice de Tablas.....	x
Índice de Figuras.....	x
Abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Células satélite en la reparación muscular.....	1
2. Papel de los factores secretados en la regulación de la regeneración muscular.....	3
3. Participación de otras células troncales en el proceso de regeneración muscular.....	6
4. Células troncales mesenquimáticas.....	9
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
1. Objetivo general.....	11
2. Objetivos específicos.....	12



MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1. Material Biológico.....	14
1.1 Células.....	14
1.2 Anticuerpos.....	15
2. Reactivos.....	16
2.1 Reactivos de Cultivo.....	16
2.2 Reactivos Generales.....	16
3. Métodos.....	17
3.1 Cultivos Celulares.....	17
3.1.1 Obtención y cultivo de CTMr.....	17
3.1.2 Obtención y cultivo de CMTh.....	18
3.1.3 Cultivo de fibroblastos de piel humana.....	19
3.2 Cultivos de Líneas Celulares.....	19
3.2.1 Células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> .....	19
3.2.2 Células MCF-7.....	20
3.2.3 Células 3T3.....	20
3.3 Diferenciación de Células troncales mesenquimáticas hacia los linajes osteogénico, adipogénico y miogénico.....	20
3.3.1 Diferenciación osteogénica.....	21
3.3.2 Diferenciación adipogénica.....	21
3.3.3 Diferenciación miogénica.....	22
3.4 Preparación de medio condicionado por músculo dañado.....	23
3.4.1 Modelo de daño muscular.....	23
3.4.2 Obtención de medio condicionado.....	23

3.5	Ensayo de actividad miogénica de los medios condicionados.....	24
3.6	Estudio de la expresión de marcadores miogénicos.....	24
3.6.1	Imunofluorescencia indirecta.....	24
3.6.1.1	Tinción de núcleos.....	25
3.6.2	Inmunomarcación de antígenos intracelulares para citometría de flujo.....	25
3.6.2.1.1	Distribución de la población celular inmunomarcada en las distintas fases del ciclo celular por cuantificación del contenido total de DNA genómico.....	26
3.6.3	Análisis por RT-PCR.....	27
3.7	Caracterización de proteínas en el medio condicionado por músculo dañado y no dañado.....	28
3.7.1	Filtración en membranas de tamaño de poro definido.....	28
3.7.2	Detección específica de proteínas.....	29
3.7.2.1	Detección de citoquinas.....	29
3.7.2.2	Detección de IGF-1.....	30
3.7.3	Efecto de las proteínas presentes en el medio condicionado por músculo dañado en la proliferación y diferenciación miogénica.....	30
3.7.3.1	Inhibición de la actividad biológica.....	30
3.7.3.2	Efecto de IGF-1 exógeno.....	31
3.8	Técnicas generales.....	31
3.8.1	Recuento y viabilidad celular.....	31
3.8.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
3.8.3	Tinción de geles de poliacrilamida.....	32
3.9	Análisis estadístico.....	33



RESULTADOS.....	34
1. Efecto del medio condicionado por músculo dañado en la diferenciación miogénica de células troncales mesenquimáticas.....	34
1.1 Potencial de diferenciación de las células troncales mesenquimáticas obtenidas de médula ósea de rata.....	34
1.2 Obtención del medio condicionado por músculo esquelético dañado.....	38
1.3 Efecto del medio condicionado obtenido a partir de músculo dañado(MD) sobre la morfología, proliferación y diferenciación miogénica de las CTMr.....	41
1.3.1 <i>Caracterización por citometría de flujo de la diferenciación miogénica de las CTMr incubadas con MD.....</i>	50
1.3.2 <i>Análisis para demostrar que el BaCl<sub>2</sub> residual no es responsable del efecto miogénico atribuido a MD.....</i>	51
1.3.3 <i>Efecto miogénico del medio condicionado por músculo dañado mecánicamente (MD-contuso) en las CTMr.....</i>	54
2. Caracterización de factores en el medio condicionado responsables de la diferenciación miogénica de las CTMr.....	56
2.1 Efecto del MD sobre otras líneas y cultivos celulares.....	56
2.2 Estabilidad térmica de componentes del MD que estimulan la proliferación y la diferenciación miogénica de CTMr.....	62
2.3 Análisis de las proteínas componentes del MD.....	62
2.4 Caracterización de las proteínas presentes en el MD mediante filtración en tamices moleculares.....	64
2.4.1 <i>Análisis de las proteínas presentes en las fracciones MD-A y MD-B.....</i>	64
2.4.2 <i>Efecto de los componentes de las subfracciones del MD sobre la</i>	

<i>proliferación y la diferenciación miogénica de las CTMr</i> .....	65
3. Análisis de proteínas candidato vinculadas al daño y/o regeneración muscular que serian responsables del efecto de diferenciación miogénico producido por MD en las CTMr.....	69
3.1 Determinación de la presencia de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IGF-1 en el MD.....	69
3.2 Efecto de IL-6 e IGF-1 contenidos en el MD sobre la diferenciación miogénica de progenitores musculares.....	71
3.2.1 Participación de IL-6 e IGF-1 en el efecto proliferativo asociado a MD.....	72
3.3 Efecto de IGF-1 exógeno sobre la diferenciación miogénica de las CTMr.....	73
 DISCUSIÓN.....	 79
1. Factores solubles derivados del tejido muscular esquelético dañado inducen la diferenciación miogénica de las CTMr.....	83
2. Los factores con actividad proliferativa y miogénica segregan en la fracción de proteínas de tamaño molecular superior a 50 kDa.....	86
3. El medio condicionado por músculo dañado contiene proteínas vinculadas a la respuesta al daño y regeneración muscular.....	88
4. IGF-1 y no IL-6 participa en la diferenciación miogénica inducida por el medio condicionado por músculo dañado.....	90
5. Implicancias y proyecciones.....	92
 CONCLUSIONES.....	 94
 BIBLIOGRAFÍA.....	 96

## INDICE DE TABLAS

### Resultados

Tabla 1: Resumen de los cambios en la expresión de los marcadores miogénicos inducidos por el MD en las CTMr.....	49
Tabla 2: Expresión de marcadores miogénicos en distintas líneas celulares y cultivos primarios a los 7 días en cultivo con MD.....	61

## INDICE DE FIGURAS

### Introducción

Figura 1: Representación esquemática de los eventos moleculares y posible papel de factores de crecimiento y citoquinas en el proceso de regeneración muscular.....	7
---	---

### Resultados

Figura 2: Diferenciación osteogénica, adipogénica y miogénica de CTMr.....	35
Figura 3: Curva de crecimiento de las CTMr.....	36
Figura 4: Expresión de MyoD en las CTMr inducidas a diferenciar hacia linaje miogénico.....	39

Figura 5:	Esquema de obtención del medio condicionado por músculo dañado.....	40
Figura 6:	Efecto del MD sobre la proliferación de las CTMr.....	42
Figura 7:	Efecto del MD sobre la morfología de las CTMr.....	45
Figura 8:	Expresión de marcadores de diferenciación miogénica temprana en CTMr incubadas con MD.....	46
Figura 9:	Expresión de MyoD en las CTMr expuestas a MD.....	47
Figura 10:	Expresión de marcadores miogénicos intermedios y tardíos en CTMr incubadas con MD.....	48
Figura 11:	Caracterización de la diferenciación miogénica de las CTMr incubadas con MD mediante citometría de flujo.....	52
Figura 12:	Efecto de BaCl <sub>2</sub> sobre la proliferación de las CTMr.....	53
Figura 13:	Efecto de MD-contuso sobre la proliferación y diferenciación miogénica de las CTMr.....	55
Figura 14:	Efecto del MD sobre la proliferación y la morfología de líneas celulares MCF-7, 3T3 , fibroblastos de piel y CTM humanas.....	58
Figura 15:	Efecto del MD sobre la proliferación y la morfología de mioblastos C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> .....	59
Figura 16:	Efecto del MD sobre la diferenciación miogénica de los mioblastos C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> .....	60
Figura 17:	La actividad estimuladora de la proliferación presente en el MD es termo sensible.....	63
Figura 18:	Patrón electroforetico de las proteínas componentes del MD y del MnD.....	66

Figura 19: Análisis de las proteínas obtenidas del fraccionamiento del MD mediante tamices moleculares.....	67
Figura 20: Efecto de componentes de las fracciones de MD sobre la proliferación y diferenciación miogénica de las CTMr.....	68
Figura 21: Detección de las citoquinas IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IGF-1 en MD.....	70
Figura 22: Efecto de la neutralización de IL-6 e IGF-1 en el MD sobre la diferenciación miogénica de progenitores musculares.....	74
Figura 23: Contribución de IL-6 e IGF-1 al efecto proliferativo del MD.....	75
Figura 24: Efecto de IGF-1 exógeno sobre la proliferación de las CTMr.....	76
Figura 25: Efecto de IGF-1 exógeno sobre la diferenciación miogénica de las CTMr.....	78

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -MEM	medio esencial mínimo alfa
bHLH	domino básico formado por una hélice-vuelta-hélice
BrEt	bromuro de etidio
CMN	células mononucleadas
CTM	células troncales mesenquimáticas
CTMr	células troncales mesenquimáticas de rata
CMTh	células troncales mesenquimáticas humanas
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGF	factor de crecimiento epidermal
ELISA	enzima inmunoensayo
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	isotiocianato de fluoresceína
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
h	hora
IBMX	isobutilmetilxantina
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo I
IGFBPs	proteínas de unión a IGFs
IL-6	interleuquina 6

kDa	kilo Daltones
LIF	factor inhibidor leucémico
min	minutos
MO	médula ósea
MD	medio condicionado por músculo dañado
MnD	medio condicionado por músculo no dañado
MRFs	factores reguladores musculares
MRF4	factor regulador de la miogénesis tipo 4
MyoD	miogenina D
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI	ioduro de propidio
RIA	radioinmunoensayo
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reacción de transcripción inversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SC	suero de caballo
SFB	suero fetal bovino
Ta	temperatura ambiente
TA	<i>tibialis anterior</i>
TAE	tampón Tris-acetato-EDTA
TBE	tampón Tris-borato-EDTA
TBS	tampón Tris salino
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante tipo $\beta$

TEMED	N',N',N',N'-tetrametiletilamina
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral tipo $\alpha$
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina
UV	ultravioleta

## RESUMEN

La capacidad de regeneración del músculo esquelético de mamíferos adultos es normalmente atribuida a las células satélite. Sin embargo, recientes investigaciones revelan la contribución de células troncales derivadas de la médula ósea al proceso de regeneración muscular. Entre éstas, se encuentran las células troncales mesenquimáticas, poseedoras de un potencial de diferenciación hacia varios linajes.

La reparación funcional del músculo requeriría de condiciones locales que favorezcan el proceso de miogénesis. Se ha propuesto que factores liberados del tejido muscular dañado contribuirían a iniciar la regeneración muscular, promoviendo la diferenciación miogénica de progenitores musculares, tales como las células satélite o las células troncales de la médula ósea. El objetivo central de esta tesis fue estudiar el(los) factor(es) derivados del tejido muscular dañado capaces de inducir la diferenciación miogénica de células troncales mesenquimáticas de la médula ósea. Para abordar este objetivo se obtuvo medio condicionado por músculo esquelético de rata, dañado previamente *in vivo* y se evaluó su capacidad para inducir la diferenciación miogénica de las células troncales mesenquimáticas aisladas de la médula ósea de rata.

Las células troncales mesenquimáticas cultivadas en presencia del medio condicionado por músculo dañado mostraron a las 48 h un aumento transitorio en la expresión del factor de transcripción MyoD, seguido por la formación de células multinucleadas con morfología alargada a los 7 días, que exhibían contracción espontánea y mostraban expresión de miogenina,  $\alpha$ -actinina y miosina. El medio condicionado por músculo dañado también indujo la diferenciación miogénica de la línea celular de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, pero no de la línea de fibroblastos de embrión de

ratón 3T3, de epitelio mamario MCF-7 o cultivo de fibroblastos de piel. Por otra parte, el medio condicionado por músculo dañado, estimuló la proliferación tanto de células troncales mesenquimáticas como de células miogénicas de distinto origen y también, de células no miogénicas. Estos resultados señalan que el músculo de rata dañado libera factores difusibles que inducen específicamente la diferenciación de células progenitoras con potencial miogénico, incluyendo aquellas de la médula ósea de rata.

Estos factores solubles miogénicos estaban contenidos en una fracción de proteínas con tamaño molecular aparente  $\geq$  a 50 kDa. De aquellas proteínas tradicionalmente vinculadas con daño y regeneración muscular, se determinó la presencia de IL-6, IL-1 $\beta$  e IGF-1 en el medio condicionado por músculo dañado. Las dos primeras no fueron detectables en medio condicionado control, mientras que IGF-1 estaba presente en ambas condiciones, aunque su concentración era 3 veces superior en el medio condicionado por músculo dañado. Los resultados indicaron que el IGF-1 del medio condicionado contribuye a la inducción de la diferenciación miogénica de las células troncales mesenquimáticas. Sin embargo, la exposición de éstas al IGF-1 fue insuficiente para alcanzar el grado de diferenciación terminal logrado al estimularlas con el medio condicionado por músculo esquelético dañado.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que factores liberados desde el tejido muscular dañado son capaces de inducir el complejo proceso de diferenciación miogénica en las células troncales mesenquimáticas de la médula ósea y de otras células con potencial miogénico. Uno de los factores presentes en el medio condicionado, IGF-1, sería en parte responsable de los efectos descritos. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión del complejo proceso de regeneración del tejido muscular. La profundización acerca de los distintos factores que controlan la regeneración muscular a partir de células progenitoras residentes, como de aquellas

provenientes de otros tejidos, proporcionará apoyo a futuras intervenciones terapéuticas en la regeneración del tejido muscular.

## ABSTRACT

It has been suggested that regeneration of mammalian adult skeletal muscle relies mainly on satellite cells. However, recent studies have revealed that bone marrow derived stem cells, including mesenchymal stem cells, may also contribute to muscle regeneration. Mesenchymal stem cells show the capacity to differentiate into several lineages.

Muscle repair would require an appropriate environment for the initiation of the myogenic differentiation process. It has been proposed that factors released from injured muscle may contribute to creating the adequate conditions for muscle regeneration, promoting the myogenic differentiation of progenitor cells, such as resident satellite cells or bone marrow derived mesenchymal stem cells. The aim of this thesis was to investigate factor(s) released from damaged muscle that are able to induce myogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells. To this purpose, conditioned medium was obtained from *in vivo* damaged rat skeletal muscle and its ability to stimulate myogenic differentiation was assessed on rat bone marrow mesenchymal stem cells.

Mesenchymal stem cells grown in the presence of conditioned medium from damaged muscle, showed a transient increase of MyoD expression at 48 h, that was followed by the formation of multinucleated, elongated cells that at 7 days exhibited spontaneous twitching and the expression of myogenin,  $\alpha$ -actinin and myosin. Conditioned medium from damaged muscle was also able to elicit myogenic differentiation of the myoblastic cell line C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, but not of cell lines from mouse embryonic fibroblasts 3T3, from mammary epithelial MCF-7 or cultures of skin

fibroblast. In addition, damaged-muscle conditioned medium stimulated proliferation of bone-marrow mesenchymal stem cells, the myogenic cell line C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> and non-myogenic cells from different sources. These results demonstrate that rat damaged muscle releases soluble factor(s) that specifically induce differentiation of myogenic progenitor cells, such as rat bone marrow mesenchymal cells.

The soluble myogenic factors were present in a protein fraction with an apparent molecular weight  $\geq$  50 KDa. Among proteins traditionally involved in muscle repair/regeneration, IL-6, IL-1 $\beta$  and IGF-1 were found in the conditioned medium from damaged muscle. Both, IL-6 and IL-1 $\beta$  were absent from control conditioned medium, whereas, IGF-1 was present in both damaged and control conditions, but its concentration was 3 fold higher in damaged-muscle-conditioned medium. The results showed that IGF-1 in the conditioned medium triggered myogenic differentiation of mesenchymal stem cells. However, exposure to IGF-1 was unable to produce the full mature phenotype observed when mesenchymal stem cells were stimulated with media conditioned by damaged skeletal.

Taken together, the results reported in this thesis show that soluble factors released from damaged skeletal muscle are able to induce the complex muscle differentiation process in rat bone marrow derived mesenchymal stem cells and other myogenic cells. IGF-1 is present in the conditioned medium from damaged muscle and it is partially responsible for the effects mentioned above. The findings here reported contribute to understanding the complex process of muscle regeneration. Further investigations of the diverse factors that control muscle regeneration from resident muscle progenitors, as well as from myogenic cells derived from different tissues, will provide a support to future therapeutic interventions aimed to muscle tissue regeneration.

## INTRODUCCION

El músculo esquelético de mamíferos adultos es un tejido que tiene la capacidad de reparar y regenerar rápida y completamente en respuesta a un daño severo (Seale y Rudnicki, 2000; Chargé y Rudnicki, 2004).

En la regeneración muscular se distinguen dos etapas: una fase degenerativa y una fase regenerativa, independientemente si el daño es infringido por un trauma físico directo o por un defecto genético. El primer evento es habitualmente gatillado por la disrupción del sarcolema de la miofibra, que se refleja en el aumento de los niveles séricos de proteínas musculares, pérdida de la homeostasis del calcio y aumento de la proteólisis dependiente de calcio que conduce a la degeneración del tejido. Los eventos tempranos se acompañan de la activación de células mononucleadas, principalmente de células del tipo inflamatorio (neutrófilos y macrófagos) y de células miogénicas (conocidas como células satélite), que participan en la siguiente fase del proceso de regeneración muscular.

### **Células satélite en la reparación muscular**

A las células satélite se les atribuye la función de contribuir al crecimiento, reparación y mantención del tejido muscular esquelético (Bischoff, 1994; Seale y Rudnicki, 2000; Zammit y Beauchamp, 2001). Son una población de células mononucleares indiferenciadas, que se localizan en la periferia de las fibras musculares, entre su membrana plasmática y la lámina basal, lo que dio origen a su nombre (Mauro,

1961). Normalmente estas células se encuentran en estado de reposo proliferativo o quiescente, pero pueden ser activadas e inducidas a la diferenciación miogénica en respuesta a estrés por trauma físico, ejercicio o a consecuencia de diferentes miopatías (Bischoff, 1994; Grounds, 1998).

En el curso de la regeneración muscular, las células satélite primero salen de su estado de quiescencia, migran al sitio del daño y comienzan a proliferar. Después de varios ciclos de proliferación, la mayoría de las células satélite inicia la diferenciación miogénica y se fusionan para formar nuevas fibras musculares o reparar la miofibrila dañada (Schultz y col., 1985). El proceso de activación y diferenciación de las células satélite durante la regeneración muscular se asemeja al desarrollo muscular embrionario, particularmente en el programa de expresión de los factores reguladores de la miogénesis (MRFs) (Parker y col., 2003). Entre los MRFs están Myf-5, MyoD, miogenina y MRF4, que pertenecen a la familia de factores de transcripción caracterizados por su dominio de unión al DNA denominado básico/hélice-vuelta-hélice (bHLH).

A nivel molecular, la activación de las células satélite se caracteriza por una rápida inducción de la expresión de MyoD o Myf-5, que se inicia antes de su entrada en ciclo celular y que se mantiene durante la fase de proliferación (Smith y col., 1994; Cooper y col., 1999). Las evidencias apuntan a que Myf-5 promueve la proliferación de los mioblastos. Los estudios realizados en músculos deficientes en *MyoD* sugieren un papel esencial de el factor de transcripción MyoD en el proceso de regeneración muscular, cuyo papel predominante sería en cambio promover la progresión de las

células satélite hacia la diferenciación terminal (Megoney y col., 1996; Sabourin y col., 1999; Montarras y col., 2000).

Al cesar la proliferación de los progenitores miogénicos aumenta la expresión de miogenina y *MRF4* y las células comienzan su programa de diferenciación terminal (Smith y col., 1994; Cornelison y Wold, 1997). Finalmente este programa se completa con la expresión de proteínas musculares específicas, tales como la cadena pesada y liviana de la miosina y la fusión de los progenitores para el reemplazo de las fibras musculares.

#### **Papel de los factores secretados en la regulación de la regeneración muscular**

El proceso de regeneración muscular está regulado por mecanismos que involucran interacciones célula-célula, interacciones de las células con la matriz extracelular y por factores secretados al medio extracelular. En relación a lo último, se ha observado que extractos de músculo dañado *ex vivo* contienen mitógenos que actúan sobre las células satélite (Bischoff, 1986; Chen y Quinn, 1992). Para entender el papel de las señales extracelulares en la regulación del proceso de regeneración, se han realizado numerosos estudios *in vitro* con líneas celulares mioblásticas. Estos estudios han involucrado a varios factores de crecimiento y citoquinas en funciones reguladoras de la diferenciación muscular, tanto positivas como negativas (Seale y Rudnicki, 2000; Chargé y Rudnicki, 2004). Sin embargo, la función fisiológica en la regeneración muscular ha sido demostrada sólo para algunos factores.

A continuación se detallan algunos estudios acerca de estos factores de crecimiento y citoquinas.

El factor de crecimiento de hepatocitos, HGF, se menciona como un regulador clave de la actividad de las células satélite durante la regeneración muscular. Los estudios *in vitro* demuestran que HGF es capaz de sacar a las células satélite del estado quiescente y aumentar la proliferación de las células progenitoras musculares (Tatsumi y col., 1998). Además se encontró que HGF está presente en extractos de músculo dañado *ex vivo* y también en los músculos en fase temprana de la regeneración muscular cuyos niveles del transcrito y de la proteína aumentan transitoriamente (Tatsumi y col., 1998; Hayashi y col., 2004). En etapas más tardías de la regeneración muscular, el HGF, bloquea o inhibe el proceso de reparación (Miller y col., 2000). Otros datos indican que este factor también podría promover la migración de las células satélite al sitio de daño (Bischoff, 1997). En conjunto, estos datos indican que HGF tendría un papel en la fase inicial de la regeneración muscular como mitógeno y quimiotáctico; sin embargo, no sería importante para la diferenciación de los progenitores miogénicos.

Algunos factores de crecimiento de fibroblastos, FGFs, han sido descritos como potentes activadores de la proliferación de células progenitoras musculares y también, como inhibidores de la diferenciación de los mioblastos (Allen y Boxhorn, 1989; Sheehan y col., 2000). Sin embargo, el papel de FGFs en la regeneración muscular permanece poco claro, sugiriéndose una participación indirecta en el proceso, a través de promover la re-vascularización durante la regeneración del músculo (Lefaucheur y col., 1996).

Los factores de crecimiento tipo insulínico, IGFs, son capaces de alterar la expresión de MRFs y de promover tanto la proliferación como la diferenciación/fusión de los mioblastos *in vitro* (Florini y col., 1991). Se ha observado que en los músculos

esqueléticos que están en proceso de regeneración, los niveles de IGFs están aumentados; IGF-1 más que IGF-2 (Hayashi y col., 2004). El aumento de los niveles de IGF-1 en músculo normal produce aumento de la masa muscular, efecto atribuido a la activación y proliferación de las células satélite; mientras que en músculo dañado, este aumento de IGF-1 incrementa su regeneración (Adams y McCue, 1998; Musaro y col., 2001; Musaro y col., 2004). Aunque es evidente que IGFs promueven la reparación muscular, el mecanismo exacto por el cual estos factores actúan no ha sido determinado.

Factores de crecimiento de la familia de los TGF- $\beta$ , como miostatina, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento muscular (McPherron y col., 1997). Estudios *in vitro* demostraron que miostatina inhibe la proliferación y afecta la diferenciación de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Ríos y col., 2002). Durante la regeneración del músculo dañado por inyección de notoxina, la expresión de *miostatina* está aumentada, tanto en las fibras necróticas como en el tejido conectivo y su expresión va disminuyendo a medida que el proceso de regeneración avanza (Kirk y col., 2000). Las evidencias reportadas indicarían que miostatina regula la regeneración muscular, actuando como inhibidor de la proliferación de mioblastos y del crecimiento de la fibra.

Evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren la participación de citoquinas de la familia de la interleuquina 6, IL-6 y LIF, en la regeneración muscular. Los estudios muestran que ambos estimulan la proliferación de mioblastos en cultivo y la administración de LIF en el sitio del daño muscular incrementa su regeneración (Austin y col., 1992; Kurek y col., 1996). Se ha detectado que después de un daño muscular la expresión de LIF aumenta a las 3 h, mientras que el aumento de IL-6 es detectado entre

las 12 a 24 h posteriores al daño (Kurek y col., 1996). Si bien LIF e IL-6 pueden representar a los putativos factores secretados por células del tipo inflamatorias reclutadas al lugar de daño muscular, la expresión de ambos también ha sido detectada en las células miogénicas (Kurek y col., 1996; Kami y Senba, 1998).

Un resumen de los eventos moleculares y el posible papel de factores de crecimiento y citoquinas durante el proceso de regeneración muscular esquelética se esquematizan en la Figura 1.

### **Participación de otras células troncales en el proceso de regeneración muscular**

Hasta hace poco, las células satélite eran consideradas como las únicas progenitoras capaces de reparar el músculo esquelético. Sin embargo, desde hace algún tiempo las investigaciones han identificado y caracterizado células troncales adultas presentes en distintos tejidos que tienen la capacidad de diferenciar, tanto *in vitro* como *in vivo*, hacia varios linajes dependiendo de los inductores o señales a las que sean expuestas (Blau y col., 2001; Young y col., 2001). En particular, células troncales distintas de las células satélite, con la capacidad de diferenciar a células musculares *in vitro* y de contribuir a la regeneración *in vivo*, han sido purificadas desde la médula ósea (MO) (Wakitani y col., 1995; Ferrari y col., 1998; Bittner y col., 1999; LaBarge y Blau, 2002; Abedi y col., 2004; Suva y col., 2004; Lee y col., 2005), pero también, desde el músculo esquelético adulto (Gussoni y col., 1999; Asakura y col., 2002; Polesskaya y col., 2003) y desde otros tejidos mesenquimales (Young y col., 2001; Zuk y col., 2001; De Bari y col., 2003).

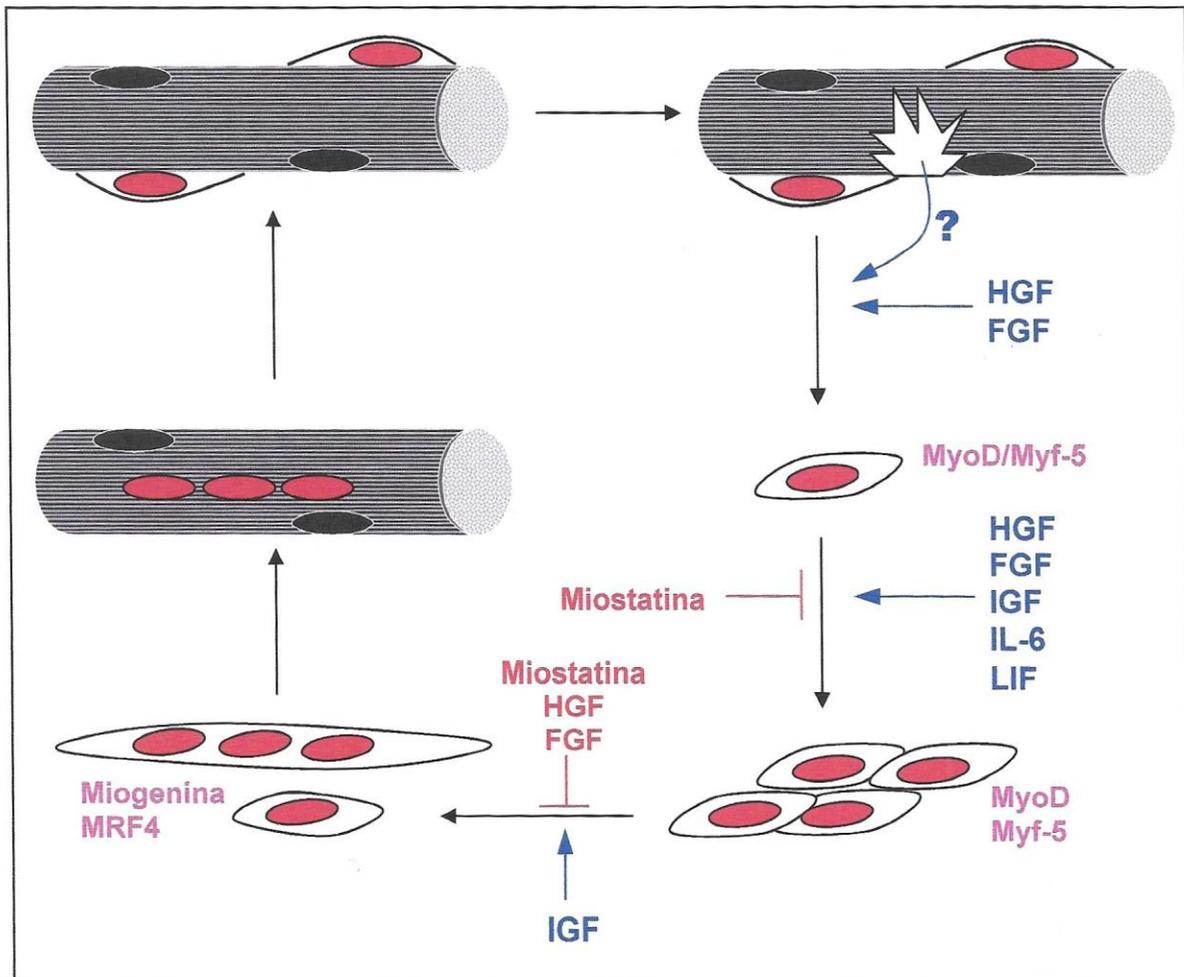


FIGURA Nº 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS EVENTOS MOLECULARES Y POSIBLE PAPEL DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS EN EL PROCESO DE REGENERACIÓN MUSCULAR

Las células satélite de un músculo de adulto son activadas por trauma físico o por ejercicio, lo que se traduce en la entrada en ciclo y proliferación de las células miogénicas. Las células satélite activadas se caracterizan por la alta expresión de los MRFs, MyoD y Myf-5. La proliferación es seguida por la diferenciación terminal y fusión de los mioblastos a la fibra dañada para su reparación. La diferenciación terminal se caracteriza por el aumento en la expresión de los MRFs, miogenina y MRF4. Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido para varios factores de crecimiento y citoquinas un posible papel como reguladores positivos y negativos del proceso de regeneración muscular.

La primera demostración que otras células troncales pueden participar en la regeneración muscular fue presentada por Ferrari y col., en 1998. En este trabajo se describió que las células troncales de la MO migraban hacia zonas del músculo que había sido dañado químicamente en ratones y se diferenciaban a linaje miogénico, participando en la regeneración de la fibra muscular. Observaciones similares fueron presentadas en otros estudios (Bittner y col., 1999; Gussoni y col., 1999). Estos apuntaban al reclutamiento y diferenciación de células derivadas de la MO en el músculo esquelético, como también en el músculo cardíaco de ratones mdx. Estos trabajos pioneros que mostraban el potencial uso de las células troncales de la MO para regenerar tejido muscular cardíaco (Tomita y col., 1999; Orlic y col., 2001; Toma y col., 2002) generaron bastante expectativa y hasta hoy en día se investiga activamente en ello (Dai y col., 2005). Más recientemente, LaBarge y Blau, 2002 no sólo demostraron que las células derivadas de la MO pueden contribuir a la regeneración de la miofibra, sino que también pueden repoblar el compartimiento de las células satélite en respuesta al daño (Fukada y col., 2002; Dreyfus y col., 2004). Incluso, pueden incorporarse en la fibra muscular en respuesta a estrés fisiológico como ocurre a consecuencia de una aumentada actividad muscular o ejercicio físico (Palermo y col., 2005).

La mayoría de los trabajos que estudian la participación de las células de la MO en la regeneración o reparación del músculo muestran que, independientemente del mecanismo de generación del daño (irradiación, toxinas, miopatías, estrés muscular), esta condición incrementa significativamente la frecuencia de integración de estas células a la fibra muscular. Sin embargo, esta respuesta es bastante variable y los

estudios muestran que puede involucrar desde el 0,1% hasta casi el 20% del total de núcleos de la fibra reparada (Wagers y Weissman, 2004).

### **Células troncales mesenquimáticas**

La MO sirve como reservorio de diferentes clases de células troncales. Además de las células troncales hematopoyéticas, la MO contiene a una población de células troncales mesenquimáticas (CTM), las cuales exhiben la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes (Minguell y col., 2001).

Las CTM, también conocidas como células del estroma medular o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU), fueron identificadas originalmente como una población celular presente en la MO que tiene la capacidad para diferenciar al linaje osteogénico (Friedenstein y col., 1968; Castro-Malaspina y col., 1980). Posteriormente, se logró determinar que éstas son células multipotentes que también pueden diferenciar a otros linajes mesenquimáticos constituyentes de hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo y también, estroma hematopoyético (Pereira y col., 1995; Prockop, 1997; Conget y Minguell, 1999; Pittenger y col., 1999; Liechty y col., 2000). Publicaciones más recientes sugieren que las CTM también pueden dar origen a células hepáticas, neuronas y astrocitos (Woodbury y col., 2000; Muguruma y col., 2003).

El aislamiento y caracterización de las CTM se ha basado en la capacidad de estas células de adherirse al plástico y en su potencial de expansión *ex vivo*. La expansión de las CTM requiere el uso de medios de cultivo enriquecidos con suero, principalmente suero fetal bovino (SFB) (Prockop, 1997).

El potencial de diferenciación de las CTM hacia los distintos linajes mesenquimales (hueso, cartilago y tejido adiposo), ha sido usado comúnmente como el criterio para la caracterización funcional de las CTM. Para promover la diferenciación *in vitro* a los distintos linajes, las CTM son cultivadas en la presencia de inductores químicos como por ejemplo: dexametasona, isobutilmetilxantina, indometacina,  $\beta$ -glicerolfosfato, ácido ascórbico, etc. (Pittenger y col., 1999; Jones y col., 2002; Gregory y col., 2005a). En particular, la diferenciación *in vitro* de las CTM hacia el linaje miogénico fue reportado por primera vez luego de exponer a las CTM a 5-azacitidina, un agente desmetilante del DNA (Wakitani y col., 1995). Sin embargo, los estímulos fisiológicos que inducen y modulan la diferenciación a los distintos linajes, entre otros, al linaje miogénico no se conocen.

Los potenciales de autorenovación y de diferenciación que exhiben las CTM ofrecen interesantes perspectivas para su uso en terapias biológicas dirigidas a reemplazar o reparar tejidos (Kan y col., 2005), como también en terapias génicas (Conget y Minguell, 2000). En particular, en lo que se refiere a la regeneración muscular, se vislumbra la posibilidad de desarrollar intervenciones para el tratamiento de enfermedades que afectan a este tejido tales como distrofia muscular, sarcopenia, caquexia y diabetes.

Para avanzar en esa dirección se hace necesario profundizar en el conocimiento de las señales y los mecanismos que regulan la regeneración muscular. De esta manera se establecerían las mejores condiciones celulares y ambientales para promover una significativa conversión miogénica de células troncales. Sin duda, el micro-ambiente en un tejido, que incluye contactos célula-célula, la matriz extracelular y los factores

solubles, es fundamental y determinante de la función de una célula troncal; ya sea para la mantención de su troncalidad como para la inducción de su diferenciación hacia un determinado linaje.

En la presente tesis nos enfocamos a estudiar señales solubles provenientes del tejido muscular dañado que inducen la diferenciación hacia linaje miogénico, ya que estas señales serían las primeras en dar cuenta del requerimiento de células troncales para iniciar el proceso de reparación de la fibra muscular esquelética.

## HIPÓTESIS

El daño en el tejido muscular, un denominador común en los estudios que muestran que células troncales adultas se diferencian hacia el linaje miogénico, lleva a postular que, “el micro-ambiente del músculo dañado contiene señales difusibles capaces de inducir el proceso de diferenciación miogénico de las células troncales mesenquimáticas derivadas de la MO.”

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el(los) factores(es) solubles derivados del tejido muscular dañado capaces de inducir diferenciación miogénica de las células troncales mesenquimáticas aisladas de la médula ósea.

### Objetivos específicos

1. Estudiar *in vitro* la capacidad de factores solubles provenientes del tejido muscular dañado para inducir diferenciación de las CTM hacia linaje miogénico
  - 1.1 Comprobar el potencial de diferenciación de las células obtenidas de médula ósea de rata.
  - 1.2 Obtener los factores solubles provenientes del músculo dañado mediante el condicionamiento de medio por músculo esquelético dañado.
  - 1.3 Determinar el efecto del medio condicionado sobre la morfología, proliferación y diferenciación miogénica de las CTM de rata (CTMr).
  
2. Caracterizar el(los) factores del medio condicionado por músculo dañado que inducen diferenciación miogénica de las CTMr.
  - 2.1 Estudiar el efecto del medio condicionado sobre otras líneas y cultivos celulares.
  - 2.2 Determinar la estabilidad térmica de el(los) factores presente en el medio condicionado que estimulan la proliferación e inducen diferenciación miogénica de las CTMr.
  - 2.3 Analizar las proteínas componentes del medio condicionado.
  - 2.4 Caracterizar las proteínas presentes en el medio condicionado mediante filtración en a través de tamices moleculares.

3. Estudiar *in vitro* la capacidad de proteínas candidato vinculadas al daño y regeneración del tejido muscular, para inducir diferenciación hacia linaje miogénico de CTMr.
  - 3.1 Detectar y cuantificar IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IGF-1 en el medio condicionado.
  - 3.2 Analizar el efecto de IL-6 e IGF-1 contenidos en el medio condicionado sobre la diferenciación miogénica de progenitores musculares.
  - 3.3 Estudiar el efecto de IGF-1 exógeno sobre la diferenciación miogénica de las CTMr

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. MATERIAL BIOLÓGICO

#### I.1 CÉLULAS

Se utilizaron cultivos de:

- a) **Células Troncales Mesenquimáticas de rata (CTMr):** CTMr fueron aisladas de la MO de ratas Wistar adultas (3-5 meses) según protocolo aprobado por el Comité de Ética del INTA, Universidad de Chile.
- b) **Células Troncales Mesenquimáticas humanas (CMTh):** CMTh fueron aisladas a partir del material sobrante de cosechas de MO obtenidas de individuos sanos, que participaban como donantes en transplantes alogeneicos, según protocolos aprobados por el Comité de Ética de Clínica Las Condes, Santiago.
- c) **Fibroblastos de piel:** Fibroblastos de piel fueron aislados a partir de biopsias de piel humana normal de adultos sanos sometidos a cirugía plástica convencional, previo consentimiento del paciente. Subcultivo terciario de fibroblastos de piel humano fue donado por la Dra. Mireya Fernández, Universidad de Chile.

También se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- a) **C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (ATCC CRL-1772):** subclón derivado de Blau y col., 1985 utilizando la línea celular establecida por Yaffe y Saxel en 1977 a partir

de la pierna de ratón C3H normal. Un subcultivo de esta línea celular fue donado por el Dr. Enrique Jaimovich, Universidad de Chile. Esta línea celular fue usada como control de progenitores musculares.

- b) **MCF-7** (ATCC HTB-22): células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de glándula mamaria.
- c) **3T3** (ATCC CRL-1568): células derivadas de la línea establecida por G. Todazo y Green en 1962 a partir de embriones de ratón.

## ***1.2 ANTICUERPOS***

De Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA se obtuvieron los siguientes anticuerpos: anticuerpos policlonales de conejo anti-Myf5, anti-MyoD y anti-miogenina, así también anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo conjugado con FITC y con rodamina e IgG anti-ratón conjugado con FITC.

De Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA se obtuvieron los siguientes anticuerpos: monoclonal de ratón anti-miosina esquelética (clon MY-32), anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con TRITC, policlonal de conejo anti-desmina y monoclonal de ratón anti- $\alpha$ -actinina (clon EA-53), estos dos últimos fueron donados por el Dr. Enrique Jaimovich, Universidad de Chile.

De Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa, IA fue obtenido el anticuerpo monoclonal de ratón anti-miosina (MHC, clon MF-20).

De USBiological, Massachussets, USA se obtuvieron los anticuerpos policlonales de cabra anti-IGF1 de ratón y de cabra anti-IL6 de rata.

## 2. REACTIVOS

### 2.1 REACTIVOS DE CULTIVO

De Gibco, Invitrogen Corporation (USA) se obtuvo el medio de cultivo mínimo  $\alpha$ -MEM, DMEM-high glucose, D-PBS, suero fetal bovino para el cultivo de las CTMr, suero de caballo y la mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomina).

De Hyclone (UT, USA) se obtuvo el suero fetal bovino para el cultivo de CMTh.

De Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA se obtuvo 5-azacitidina, Ficoll-Hypaque, tripsina, DMSO, isobutilmetilxantina (IBMX), indometacina, dexametasona, ascorbato-2-fosfato y  $\beta$ -glicerolfosfato.

De USBiological, Massachussets, USA se obtuvo IGF-1 recombinante de ratón.

### 2.2 REACTIVOS GENERALES

De Sigma Chemicals Co., MO, USA se obtuvo bis-benzamida (Hoechst 33258), RNAsa A, Ioduro de propidio, TEMED, Tritón X-100, los colorantes azul de bromofenol, azul brillante de Coomassie R-250, cristal violeta, oil red O, alizarin red S, persulfato de amonio y acetato de amonio.

De Merck, Darmstadt, Alemania se obtuvo  $\beta$ -mercaptoetanol, EDTA, cloruro de bario, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, urea, glicerol, paraformaldehído, formaldehído, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético glacial, isopropanol, metanol y etanol absoluto.

De Gibco, Invitrogen Corporation, USA se obtuvo Taq DNA polimerasa, nucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, estándar de peso molecular DNA ladder 1Kb, agarosa y Tris.

De Bio Rad Laboratorios, Hércules, CA, USA se obtuvo acrilamida, bis-acrilamida y marcadores de peso molecular para proteínas.

De Promega, WI, USA se obtuvo el kit para purificación de RNA total “SV total RNA Isolated System” y para RT-PCR “Reverse Transcription System”.

De R&D system, Inc., Minneapolis, USA se obtuvieron los kit ELISA Quantikine para medir las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  de rata. Estos fueron donados por Marcelo López, Universidad de Chile.

De W & Z, Santiago, Chile se obtuvo el kit de Tinción con plata para proteínas, los reactivos para determinar proteínas por el método de Bradford, solución de tinción de proteínas para geles de poliacrilamida, bromuro de etidio, poliacrilamida y marcador de peso molecular de proteínas amplio rango.

De Millipore Corporation, Bedford, MA, USA se obtuvieron las unidades de filtración Amicon® Ultra-4 de 50,000 MWCO.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 *CULTIVOS CELULARES*

##### 3.1.1 *OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CTM<sub>r</sub>*

Las CTM fueron cosechadas desde la MO del fémur y tibia de ratas Wistar adultas (3-5 meses). Para aquello, animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y en condiciones asépticas se disectaron los fémures y tibias. Luego de cortar las epífisis de estos huesos se hizo pasar medio esencial mínimo ( $\alpha$ -MEM) a presión utilizando una aguja de 21G. Las células colectadas fueron disgregadas, centrifugadas (700 x g por 10 min) y suspendidas en  $\alpha$ -MEM conteniendo 10% de SFB y antibióticos

(penicilina 100 U/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml) (medio completo). En medio completo  $5 \times 10^7$  células fueron sembradas en placas de  $55 \text{ cm}^2$  e incubadas en una estufa de cultivo a  $37^\circ \text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad. A los 3 días, células no adherentes a la placa de cultivo fueron descartadas y a la monocapa de células se les restituyó su medio cultivo por medio completo y se cultivaron hasta alcanzar la condición de semiconfluencia. Las células fueron tripsinizadas (0,25% p/v de tripsina en PBS), resuspendidas en medio completo y sembradas a una densidad de 8000 células/ $\text{cm}^2$  para su expansión. En el subcultivo secundario las células fueron utilizadas en experimentos o fueron criopreservadas. Para la criopreservación las células fueron suspendidas en medio  $\alpha$ -MEM conteniendo 10% de DMSO y 80% de SFB y congeladas en nitrógeno líquido.

### 3.1.2 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CMTh

Las CMT fueron cosechadas desde la MO de individuos adultos usando heparina 100 U/ml como anticoagulante y diluidas 3 veces con  $\alpha$ -MEM. Tres volúmenes de esta suspensión celular se cargaron sobre dos volúmenes de Ficoll-Hypaque. Luego de centrifugar por 30 min a  $400 \times g$  y temperatura ambiente ( $T_a$ ), las células mononucleadas (CMN) fueron extraídas desde la interfase de la gradiente, lavadas con  $\alpha$ -MEM y centrifugadas a  $700 \times g$  por 10 min a  $T_a$ . Las CMN fueron resuspendidas en  $\alpha$ -MEM conteniendo 20% de SFB y sembradas a una densidad  $1 \times 10^6$  células/ $\text{cm}^2$ . Al cabo de una semana, las células no adherentes fueron descartadas y se repuso el medio con medio de cultivo  $\alpha$ -MEM conteniendo 20% de SFB hasta que las células alcanzaron

confluencia. La monocapa de células fue tripsinizada (0,25% p/v de tripsina en PBS), centrifugada (600 x g por 10 min), resuspendida en medio completo ( $\alpha$ -MEM, 10% de SFB) y sembradas a una densidad de 10000 células/cm<sup>2</sup>. Los cultivos expandidos fueron subcultivados cada 5 días aproximadamente, evitando alcanzar confluencia.

### 3.1.3 CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE PIEL HUMANA

Un criotubo conteniendo un subcultivo terciario de fibroblastos de piel (1 x10<sup>6</sup> células) fue descongelado a 37<sup>o</sup> C por 10 min, resuspendido en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM conteniendo 10% de SFB (medio completo) y centrifugado por 10 min a 600 x g. Las células fueron resuspendidas y cultivadas en medio completo.

## 3.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

### 3.2.1 CÉLULAS C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

Estas células fueron crecidas en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (0,1 mg/ml) e incubadas en estufa de cultivo a 37<sup>o</sup> C , 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. En el crecimiento de los cultivos se evitó que las células alcanzaran confluencia. Para los experimentos, éstas células fueron sembradas a baja densidad (1500-3000 células/cm<sup>2</sup>) en D-MEM con 10% de SFB y antibióticos por 16 horas y luego de lavarlas 2 veces con D-PBS su medio de cultivo fue reemplazado por el medio de cultivo usado en los ensayos. Para inducir la diferenciación de las C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se las incubó en medio D-MEM suplementado con 4% de suero de caballo (SC), que corresponde a su medio de diferenciación convencional.

### 3.2.2 CÉLULAS MCF-7

Las células MCF-7 fueron crecidas en medio mínimo  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (0,1 mg/ml) e incubadas en estufa de cultivo a 37<sup>o</sup> C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Para los experimentos éstas células fueron sembradas a una densidad de 6000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM con 10% de SFB por 16 horas, luego de lavarlas 2 veces con D-PBS su medio de cultivo fue cambiado por el medio de cultivo usado en los experimentos.

### 3.2.3 CÉLULAS 3T3

Las células 3T3 se crecieron en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de SFB y mezcla de antibióticos penicilina y estreptomicina (100U/ml y 0,1 mg/ml, respectivamente). Para los experimentos éstas células eran sembradas a una densidad de 2000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo D-MEM con 10% de SFB y antibióticos por 16 horas, luego de lavarlas 2 veces con D-PBS su medio de cultivo fue reemplazado por el medio de cultivo usado en los experimentos.

## 3.3 *DIFERENCIACIÓN DE CELULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS HACIA LOS LINAJES OSTEOGÉNICO, ADIPOGÉNICO Y MIOGÉNICO*

El potencial de diferenciación de las CTMr fue determinado en función de la capacidad de éstas células de generar *in vitro* y bajo los estímulos descritos células con características de osteoblastos, adipocitos maduros o células del tipo muscular.

### 3.3.1 DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA

Se sembraron CTMr a una densidad de 20000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo que contenía  $\alpha$ -MEM, 10% de SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (0,1 mg/ml). A las 24 horas posteriores, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de diferenciación osteogénico que contenía medio de cultivo suplementado con dexametasona 0,01  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerolfosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 mM (Jaiswal y cols., 1997; Peter y cols., 1998). El medio de diferenciación era cambiado cada 3 días. La aparición de osteoblastos fue evaluado por la capacidad de las células de mineralizar la matriz extracelular con depósitos de hidroxapatita. Para ello, luego de 4 semanas en cultivo en medio de diferenciación, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con etanol al 70% por 30 min a Ta. Luego se lavaron nuevamente 2 veces con PBS y se incubaron por 10 min a Ta con Alizarin Red S 40 mM en tampón NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 4,3. Posteriormente se lavó 5 veces con agua bidestilada y se incubó por otros 15 min con PBS a Ta. Los focos de mineralización se visualizaron en microscopio óptico como precipitados de color rojo.

### 3.3.2 DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA

Se sembraron CTMr a una densidad de 20000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo que contenía  $\alpha$ -MEM, 10% de SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (0,1 mg/ml). A las 24 horas posteriores, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de diferenciación adipogénico que contenía medio de cultivo suplementado con dexametasona 0,5  $\mu$ M, IBMX 0,5 mM e indometacina 60  $\mu$ M (Jones y cols., 2002). El

medio de diferenciación adipogénico fue cambiado cada 3 días. La aparición de células con el fenotipo de adipocitos fue evaluada por la observación de la acumulación de gotas de lípidos neutros en el citoplasmas de las células. Para esto, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubó 1 hora a Ta con Oil Red O saturado en isopropanol al 60% v/v. Luego de lavar con PBS fue posible visualizar por microscopio óptico desde 3 días de exposición a medio de diferenciación, los adipocitos como células redondas con abundantes gotas de lípidos teñidas intensamente de color rojo.

### 3.3.3 DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

Se sembraron CTMr a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo que contenía  $\alpha$ -MEM, 10% de SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (0,1 mg/ml). Al día siguiente las células fueron lavadas 2 veces con D-PBS e incubadas por 24 horas con medio de cultivo suplementado con 5-azacitidina 3  $\mu$ M (Wakitani y cols., 1995). Al término de la incubación las células fueron lavadas con D-PBS y cultivadas nuevamente en medio de cultivo, el cual era cambiado cada 3 días. La aparición de células del tipo miogénico fue visualizado a los 9 días posteriores de la exposición de las células a 5-azacitidina por microscopio de contraste de fase. Estas células se visualizaban como células alargadas bi- y multinucleadas y algunas presentaban ondas de contracción espontánea.

### 3.4 PREPARACIÓN DE MEDIO CONDICIONADO POR MÚSCULO DAÑADO

#### 3.4.1 MODELO DE DAÑO MUSCULAR

Siguiendo las normas del cuidado institucional de los animales y protocolos aprobados por el comité del uso de animales para investigación del INTA, Universidad de Chile, ratas Wistar adultas (3-5 meses) fueron usadas para los experimentos de daño muscular. Los animales fueron mantenidos a Ta con ciclos de día y noche de 24 h y alimentados con pellets y agua *ad libitum*. El daño muscular químico fue realizado por la inyección de una solución de BaCl<sub>2</sub> (Caldwell y cols., 1990) en ratas anestesiadas con éter. Para esto, 250 µl de una solución de BaCl<sub>2</sub> 1,2% p/v (49 mM) fue inyectada a lo largo de todo el músculo *Tibialis Anterior* (TA). Después de 2 y 4 días el músculo fue extraído bajo anestesia y los animales fueron sacrificados. El daño muscular mecánico fue realizado al dejar caer un peso de 500 gr. desde una distancia de 30 cm sobre la pierna de ratas anestesiadas (Kami y cols., 1995). Después de 2 días el músculo TA fue extraído bajo anestesia y los animales fueron sacrificados.

#### 3.4.2 OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO

Una vez realizada la extracción del músculo dañado química o mecánicamente, este rápidamente fue puesto en un vaso precipitado conteniendo 1,75 ml/músculo de α-MEM e incubado por 2 horas con agitación suave a 4º C. Posteriormente el medio de incubación fue colectado, centrifugado (18000 x g por 30 min a 4º C), filtrado a través de filtro de 0,2 µm, alícuotado y guardado a -80º C. Una alícuota fue reservada para

medir contenido de proteínas por Método de Bradford. El mismo procedimiento fue seguido para la preparación de medio condicionado control, para lo cual se usaron músculos TA de ratas sanas intactas (no sometidas a daño).

### ***3.5 ENSAYO DE ACTIVIDAD MIOGÉNICA DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS***

La actividad miogénica de los medios condicionados obtenidos fue ensayado incubando las CTMr en medio  $\alpha$ -MEM conteniendo 0,5% de SFB solo (control) o suplementando con los medios condicionados obtenidos de músculos dañados química o mecánicamente o de músculos no dañados. El medio de cultivo del ensayo era cambiado por medio fresco cada 3 días. Esto mismo fue realizado con cada tipo celular (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, MCF-7, 3T3, CMTh y fibroblastos de piel), pero incubando en sus respectivos medios de cultivo. En el tiempo que transcurrió el ensayo fue observada la morfología celular y el número y viabilidad de cada tipo celular (Métodos 3.8.1). La morfología de las células fue registrada mediante fotografías desde el microscopio de contraste de fase con cámara digital Nikon (Coolpix 4500). En paralelo, fue también estudiada la expresión de marcadores miogénicos (ver Métodos 3.6).

### ***3.6 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MIOGÉNICOS***

#### ***3.6.1 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA***

Para la detección de los marcadores miogénicos se debió permeabilizar las células sembradas sobre cubreobjetos. Para ello éstas se lavaron 2 veces con PBS a 37° C por 2 min cada vez y fueron fijadas con paraformaldehído al 1% p/v en PBS, pH 7,4 por

20 min a Ta. Luego se lavaron con PBS a Ta y se permeabilizaron por 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  con metanol absoluto. Posteriormente las células fijadas y permeabilizadas fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas por 30 min con tampón PBS, 3% SFB (solución de bloqueo). El primer anticuerpo se agregó diluido en solución de bloqueo y se incubó por 1 hora a Ta. Se utilizaron las siguientes diluciones de los primeros anticuerpos: anti-Myf5, anti-MyoD, anti-miogenina, anti-miosina(MHC) y anti-desmina 1/50, anti- $\alpha$ -actinina y anti-miosina esquelética 1/100. Después de lavar 3 veces por 2 min cada vez con solución de bloqueo, las células se incubaron por 1 hora a Ta en solución de bloqueo conteniendo las diluciones adecuadas de los anticuerpos secundarios conjugados a FITC, TRITC o rodamina. Luego se lavaron 3 veces con solución de bloqueo.

### 3.6.1.1 TINCIÓN DE NÚCLEOS

Para teñir los núcleos, luego de marcar con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios, las células se incubaron con Hoechst  $1\mu\text{g/ml}$  diluido en solución de bloqueo (PBS, 3% de SFB) por 5 min a Ta. Luego las células se lavaron 4 veces con solución de bloqueo, se montaron sobre portaobjetos y se analizaron en un Microscopio de Epifluorescencia Axiophot (Zeiss, D-37030, RFA).

### 3.6.2 INMUNOMARCACIÓN DE ANTÍGENOS INTRACELULARES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células ( $0,5 \times 10^6$  por cada inmunomarcaje) fueron tripsinizadas, centrifugadas a  $400 \times g$ , 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y resuspendidas en el volumen residual del tubo

(50  $\mu$ l) mediante suave golpes. Luego las células fueron permeabilizadas agregando gota a gota etanol al 70% v/v frío (0,6 ml/l x  $10^6$  células) e incubadas por 10 min a 4° C. Posteriormente las células permeabilizadas fueron centrifugadas a 400 x g por 10 min a 4° C, lavadas con PBS-2% de SFB y nuevamente centrifugadas para ser incubadas por 30 min a 4° C con 100  $\mu$ l del anticuerpo primario diluido (mismas diluciones que para inmunofluorescencia). Después las células se lavaron con PBS-2% de SFB y se centrifugaron a 400 x g por 10 min a 4° C. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario conjugado a FITC diluido en PBS-2% de SFB y se incubó por 30 min a 4° C. Posteriormente se lavaron con PBS-2% de SFB, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS para analizarse en el citómetro de flujo (FACScan Becton Dickinson, CA, USA). La fluorescencia emitida por FITC se detectó en el canal FL-1. Se adquirieron a lo menos 20000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software CELLQUEST. En todas las inmunomarcaciones se incluyeron controles negativos sin primer anticuerpo y/o usando un control de isotipo para el primer anticuerpo.

### *3.6.2.1 DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR INMUNOMARCADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR POR CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE DNA GENÓMICO (Juan y Darzynkiewicz, 1998)*

Una vez que las células estuvieron marcadas con el anticuerpo primario y secundario, éstas se incubaron con una solución de Ioduro de propidio (PI) 50  $\mu$ g/ml y RNAsa libre de DNAsa 0,2 mg/ml en tampón PBS por 30 min a Ta. Luego las células fueron lavadas, centrifugadas y resuspendidas en PBS para analizarlas en el citómetro

de flujo. La fluorescencia emitida por PI se detectó en el canal FL3. Se adquirieron a lo menos 20000 eventos, los cuales se analizaron utilizando el software CELLQUEST. Cada fase del ciclo fue asignada en función del contenido total de DNA genómico. Así fue posible distinguir células normoploides que estaban en las fases  $G_0/G_1$  (2n, 2c) de aquellas que estaban en  $G_2/M$  (2n, 4c) y de aquellas que estaban en fase S (2n, xc; donde  $2 < x < 4$ ).

### 3.6.3 ANALISIS POR RT-PCR

El RNA total fue extraído usando el kit “SV Total RNA Isolation System” (Promega Corp., Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se lisaron directamente en la placa de cultivo agregando  $17,5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  de solución de lisis que contenía tiocianato de guanidinio 4M en tampón Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5 y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,97% (v/v). Después de centrifugar a  $12000 \times g$  por 10 min a Ta, para eliminar los precipitados de proteínas y restos celulares, el RNA se precipitó con 0,4 volúmenes de etanol 95% v/v y se unió a una membrana de sílica centrifugando a  $12000 \times g$  por 1 min a Ta. Para eliminar el DNA genómico contaminante, se agregó directamente a la membrana de sílica DNAsa I libre de RNAsa y se incubó 15 min a Ta. Finalmente, el RNA unido se lavó con acetato de potasio 60 mM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y etanol al 60% (v/v) y se eluyó de la membrana de sílica con agua libre de nucleasas. La pureza del RNA se estimó determinando simultáneamente la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Shimatzu. La recuperación se calculó a partir de la relación para RNA hebra simple ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) =  $A_{260} \times 40 \times$  factor de dilución.

Se realizó RT-PCR utilizando el kit “Reverse Transcription System” (Promega Corp., Madison, WI). La transcripción reversa se realizó por 90 min a 42<sup>o</sup> C, usando 2 µg de RNA total. Para la amplificación específica de cDNAs se usaron cantidades equivalentes de cDNA, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mezcla de dNTPs 0,2 mM, 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 0,8 µM de los partidores sentido y antisentido. Los partidores utilizados para la amplificación de cDNA de MyoD de tamaño 200 pb fueron los siguientes: Partidor sentido: 5'-cactacagcggcgactccgacgcg-3', partidor antisentido: 5'-cgctccactatgctggacagg-3'. Como control interno se amplificó cDNA de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) de tamaño 540 pb, usando los siguientes partidores: Partidor sentido: 5'-gtcaacggatttggtcgtattgg-3', partidor antisentido: 5'-agtcttctgggtggcagtgatgg-3'.

Los fragmentos de cDNA amplificados fueron detectados y analizados luego de electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v en tampón TAE (Tris 45 mM, ácido acético y EDTA 2 mM pH 8) conteniendo 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y fotografiaron con cámara digital Kodak. La intensidad de las bandas fue medida desde fotografías digitales usando el software Kodak Digital Science ID image analysis.

### ***3.7 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MEDIO CONDICIONADO POR MÚSCULO DAÑADO Y NO DAÑADO***

#### ***3.7.1 FILTRACIÓN EN MEMBRANAS DE TAMAÑO DE PORO DEFINIDO***

Medio condicionado por músculo esquelético dañado fue fraccionado por filtración en membrana de tamaño de poro definido (Amicon Ultra-4 50,000 NMWL,

Millipore) que retiene moléculas de peso molecular nominal límite de más de 50 KDa y ultrafiltra moléculas de menos de 50 KDa. Para ello, medio condicionado por músculo dañado (Métodos 3.4) fue puesto en la unidad de filtración y centrifugado por 25 min a 4000 x g. La solución filtrada fue recuperada desde la unidad de filtración y el medio retenido fue lavado con 10 volúmenes de  $\alpha$ -MEM. Luego el medio retenido fue también recuperado desde la unidad de filtración. Una alícuota de cada fracción (retenida y filtrada) fue reservada para medir contenido de proteínas por el Método de Bradford.

Las fracciones obtenidas (retenida y filtrada) fueron usadas para ensayos de su actividad miogénica (Métodos 3.5) y las proteínas de cada fracción fueron analizadas en geles PAGE-SDS (Métodos 3.8.2).

### 3.7.2 DETECCIÓN ESPECÍFICA DE PROTEÍNAS

#### 3.7.2.1 DETECCIÓN DE CITOQUINAS

La detección de las citoquinas IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  se realizó mediante ensayos de ELISA específicos para las especies murino de las citoquinas (Quantikine M, R&D). Brevemente, los kits contienen el anticuerpo monoclonal específico para cada citoquina inmovilizados en los pozos de una micro placa. Medios condicionados por músculo dañado y no-dañado, estándares y controles fueron agregadas en cada pozo de la micro placa. Después de lavar se agregó el anticuerpo policlonal específico unido a peroxidasa de rabanito para cada citoquina. Se lavó nuevamente y se agregó el sustrato de la enzima a cada pozo. Las micro placas fueron leídas a 450 nm en lector de ELISA. Los valores de las muestras se calcularon interpolando los datos en curva estándar para cada citoquina (DO<sub>450</sub> v/s concentración pg/ml).

### 3.7.2.2 DETECCIÓN DE IGF-1

La detección de IGF-1 se realizó mediante RIA. El ensayo fue realizado en laboratorios del IDIMI en el Hospital San Borja Arriarán siguiendo el protocolo descrito por García y cols., 1996. Previo a la detección de IGF-1, se realizó una extracción en medio etanol/ácido para eliminar las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs). En breve, el IGF-1 recombinante fue iodinado usando el método de la Cloramina T (vanObberghen-Schilling y Pouyssegur, 1983). Los péptidos radiomarcados fueron separados del yodo libre por filtración en gel sobre columnas de Sephadex G-50 (1 cm x 50 cm). La actividad específica del IGF-1 fue aproximadamente de 300 mCi mg<sup>-1</sup>. La curva estándar fue establecida usando IGF-1 recombinante. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo para IGF-1 fueron de 8,6 y 10,2%, respectivamente.

### 3.7.3 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN EL MEDIO CONDICIONADO POR MUSCULO DAÑADO EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

#### 3.7.3.1 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para evaluar la participación de IL-6 e IGF-1 presentes en los medios condicionados por músculo dañado, se realizaron ensayos de inhibición de la actividad miogénica (Métodos 3.5) en presencia de anticuerpos dirigidos contra IL-6 e IGF-1. Para los ensayos se cultivaron células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en medio D-MEM conteniendo 0,5% de SFB y medio condicionado por músculo dañado (0,5 mg/ml) en presencia de anti-IL6 (0,4 µg/ml) o en presencia de anti-IGFI (7,4 µg/ml). Esta concentración de los anticuerpos neutralizantes fue 100 y 50 veces mayor respectivamente, que la

concentración inhibitoria indicada por el proveedor. El medio de cultivo fue cambiado cada 3 días por medio fresco preparado de la misma forma. A distintos tiempos se observó la morfología y se estudió la expresión de marcadores miogénicos (Métodos 3.6). Para juzgar la participación de IL-6 e IGF-1 en la proliferación, en paralelo se evaluó el número y viabilidad (Métodos 3.8.1) de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y CTMr cultivadas en medio con 0,5% de SFB y medio condicionado por músculo dañado suplementadas con los anticuerpos neutralizantes en condiciones semejantes a los ensayos miogénicos descritos anteriormente.

#### 3.7.3.2 EFECTO DE IGF-1 EXÓGENO

Para evaluar el efecto de IGF-1 exógeno sobre la proliferación y diferenciación miogénica de CTMr, se incubaron CTMr en medio  $\alpha$ -MEM conteniendo 0,5% de SFB y suplementado con IGF-1 recombinante (USBiological) a concentraciones entre 0,1 a 10 ng/ml. A distintos tiempos se observó la morfología, número y viabilidad celular (Métodos 3.8.1). La morfología de las células fue registrada mediante fotografías desde el microscopio de contraste de fase con cámara digital Nikon (Coolpix 4500). En paralelo, también se estudió la expresión de marcadores miogénicos (Métodos 3.6).

### 3.8 TÉCNICAS GENERALES

#### 3.8.1 RECUENTO Y VIABILIDAD CELULAR

Para cultivo en placas de 100 mm o de 24 pozos, el número de células viables se determinó contando el número de células que no incorporaron el colorante Azul de Tripán.

Para cultivos en pozos, el número de células se determinó además espectrofotométricamente tiñendo las células adheridas con Cristal Violeta 0,2% (p/v) en etanol 10% (v/v) por 5 min a Ta. Después de lavar 4 veces con PBS, se solubilizó el colorante unido a las células incubándolas con una mezcla 50/50 de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH 4,5 y etanol 50% (v/v) por 5 min a Ta. Finalmente se determinó la absorbancia a 570 nm en lector de micro placa y se calculó el número de células interpolando los datos en curva estándar para cada tipo celular.

### 3.8.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)

Se utilizaron geles preparados en vidrios de 10 x 7 x 0,15 cm que contenían SDS 0,1% (p/v) (Laemmli, 1970). El gel concentrador se hizo al 3% y el separador en gradiente del 5 al 15%. Las proteínas se mezclaron con tampón de muestra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% y azul de bromo fenol 0,07%) y se incubaron por 5 min a 100° C antes de ser aplicadas al gel. Los geles se corrieron a corriente constante de 10 mA (concentrador) y 20 mA (separador).

### 3.8.3 TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles fueron incubados por 3 hrs a Ta en una solución de fijación (metanol 50% y ácido acético 10%) y luego teñidos con azul brillante de Coomasie R-250 (0,25% p/v en metanol 50% y ácido acético 10%). La tinción inespecífica del gel se eliminó mediante incubaciones de 20 min en solución de desteñido (metanol 30%, ácido acético 10%). Para la tinción de las proteínas en los geles con nitrato de plata se siguieron las instrucciones el proveedor del kit (W & Z). Brevemente, los geles fueron fijados por 6 a

12 h a  $T_a$  incubando en solución de etanol 30% y ácido acético glacial 10%. Luego se lavaron con agua destilada por 5 min y con solución de lavado por 1 min más. Los geles se sumergieron en solución de tñido por 10 min y luego revelados en una mezcla de solución de revelado y fijación hasta que la intensidad de las bandas fue la adecuada. El revelado se detuvo añadiendo solución de detención y luego se lavó con agua destilada por 10 min. Los geles fueron secados aplicando calor y vacío y fueron fotografiados digitalmente con cámara Nikon (Coolpix 4500).

### ***3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

El efecto del medio condicionado por músculo dañado y no-dañado sobre la proliferación de las CTMr, fue analizado mediante ANOVA de dos vías seguido del test de comparación post hoc Tukey. El efecto de distintos tratamientos sobre la proliferación de las CTMr y los mioblastos  $C_2C_{12}$ , fue analizado mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparación post hoc Tukey. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SYSTAT® para Windows®.

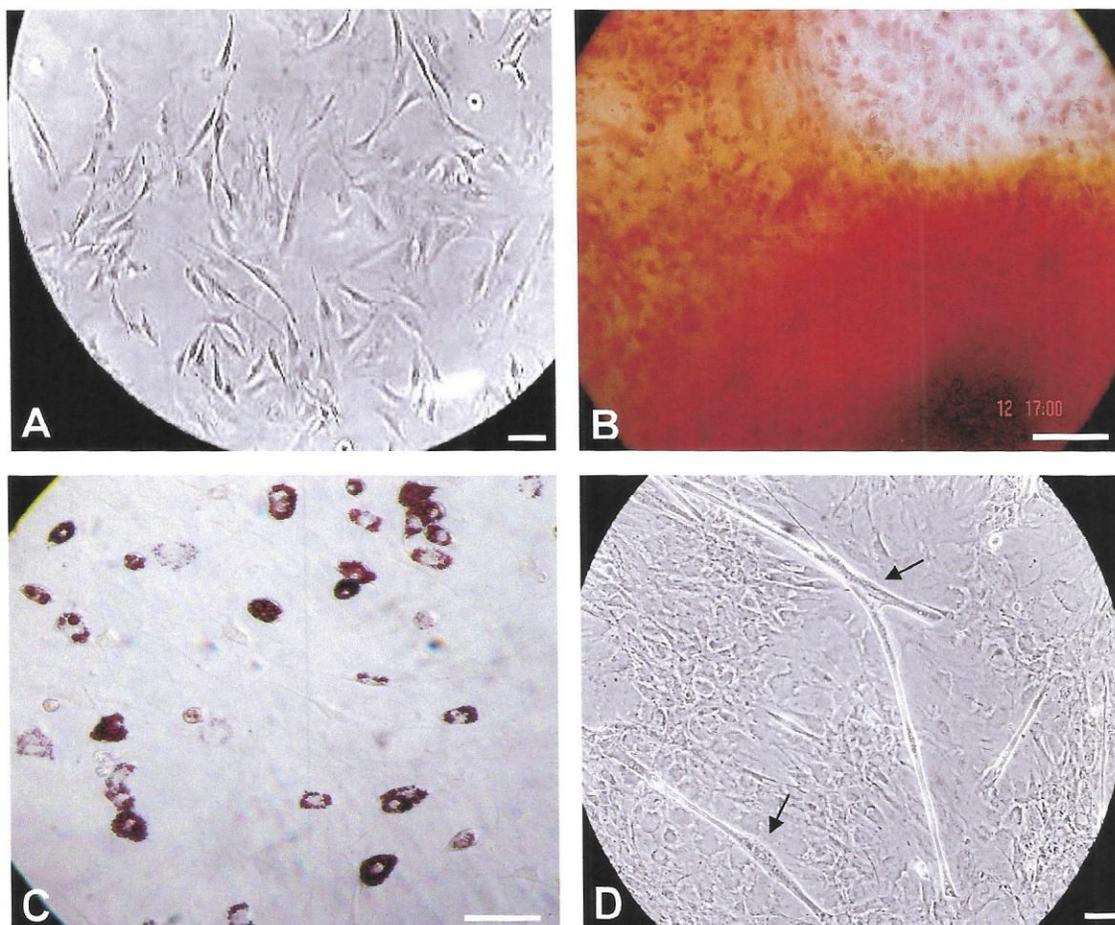
## RESULTADOS

### 1. EFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO POR MÚSCULO DAÑADO EN LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE CÉLULAS TROCALES MESENQUIMÁTICAS

#### 1.1 Potencial de diferenciación de las células troncales mesenquimáticas obtenidas de médula ósea de rata.

Con el propósito de caracterizar el modelo celular usado en esta tesis, a las CTM obtenidas de la médula ósea (MO) de rata se les analizó sus propiedades de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y miogénico. Para esto, las CTM aisladas de la MO de rata (CTMr) fueron expuestas a los distintos inductores no fisiológicos descritos para la diferenciación hacia los linajes mencionados.

En medio de cultivo conteniendo 10% de SFB, las células obtenidas de la MO de rata crecen fuertemente adheridas a la placa de cultivo, como una población con características morfológicas homogéneas del tipo fibroblastoide (Fig. 2A). El tiempo aproximado de duplicación es de 27 horas y el crecimiento celular se inhibe por contacto, cuando alcanzan confluencia (Fig. 3). Estas características se conservaron en todos los cultivos con un número de subcultivos no superior a siete. En la figura 3, también se muestra que las células cultivadas en medio conteniendo sólo 0,5% de SFB, condición control de los experimentos, detienen su crecimiento, pero permanecen



**FIGURA N° 2. DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA, ADIPOGÉNICA Y MIOGÉNICA DE CTMr.**

Las CTMr en medio completo (A) fueron expuestas a los estímulos de diferenciación osteogénico (B), adipogénico (C) y al inductor miogénico (D). Luego de diferentes periodos de estimulación las células fueron fotografiadas desde un microscopio de contraste de fase. A las 4 semanas la diferenciación osteogénica terminal se caracterizó por el depósito de una matriz mineralizada que fue posible visualizar por tinción Alizarin Red (B). En condiciones adipogénicas, desde los 3 días la acumulación citoplasmática de gotas de lípidos fue visualizada con la tinción Oil red O (C), indicativo de células en vías de diferenciación hacia adipocitos; mientras que la diferenciación miogénica se caracterizó por la formación de células alargadas y multinucleadas, como las que se señala con flechas, a los 9 días después de exponer las CTM con 5-azacitidina (D). La escala de la barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

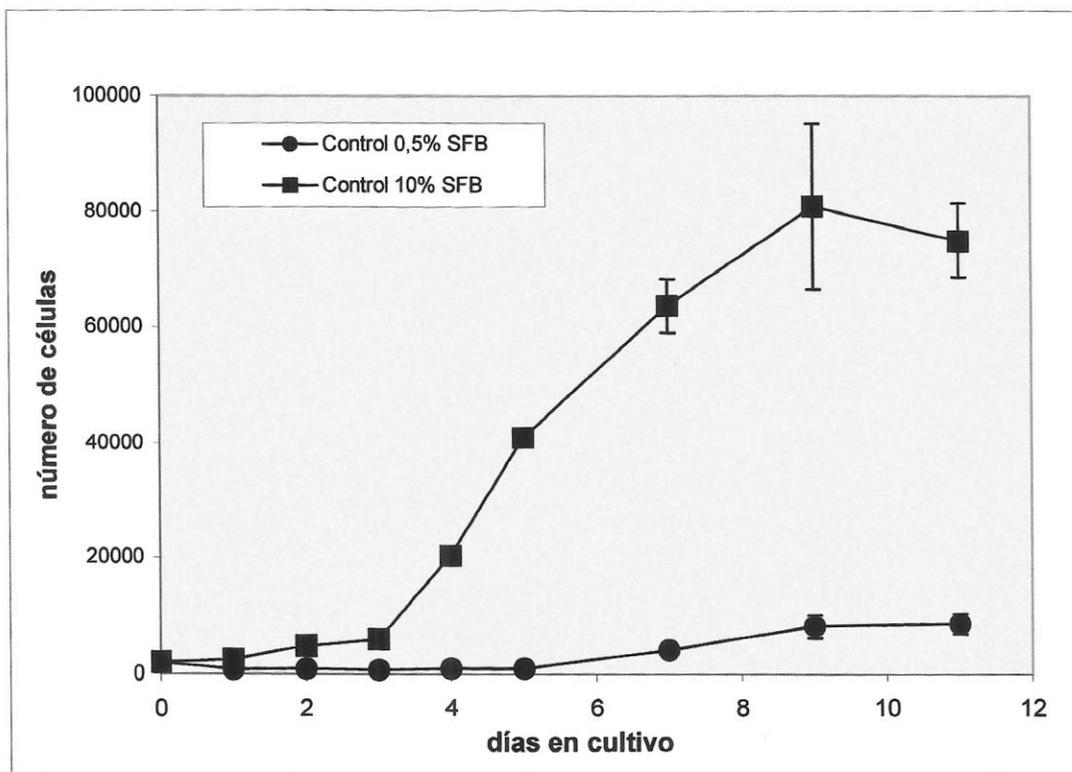


FIGURA Nº 3. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CTMr.

Las células de subcultivo secundario fueron sembradas a una densidad de 1000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio  $\alpha$ -MEM conteniendo 10% o 0,5% de SFB. A diferentes intervalos de tiempo, las células viables fueron contadas luego de tñirlas con azul de Tripán. Los datos representan el promedio del número de células  $\pm$  la desviación estándar de al menos 5 experimentos realizados por triplicado.

viables y adheridas a la placa al menos por 2 semanas, el máximo periodo usado en los estudios.

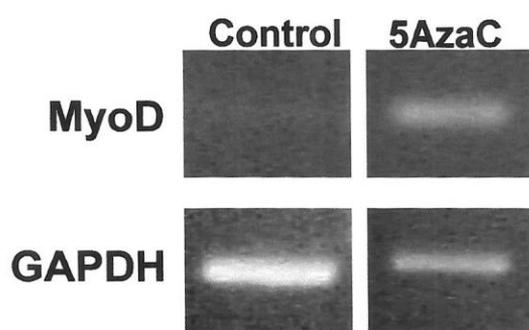
Las células incubadas en medio osteogénico mineralizaron su matriz extracelular al cabo de 4 semanas, revelando que éstas se diferenciaron a células osteoblásticas (Fig. 2B). Bajo el estímulo adipogénico, las células mostraron el fenotipo característico de adipocitos en vías de maduración, indicado por la acumulación de gotas de lípidos neutros en su citoplasma (Fig. 2C). La detección de adipocitos con gotas citoplasmáticas de lípidos comenzó a los 3 días de incubación en medio adipogénico y el número de éstos fue aumentando con el transcurso de los días; sin embargo, en cultivos con más de seis pasajes, no fue posible observarlos. Algo similar ocurrió en los estudios de diferenciación osteogénica.

La capacidad de las células de diferenciarse hacia el linaje miogénico fue analizado luego de exponer cultivos secundarios y terciarios por 24 horas al compuesto 5-azacitidina. Bajo estas condiciones, al cabo de 9 días de cultivo, se observaron algunos focos de células alargadas binucleadas o multinucleadas (Fig. 2D). El número de focos fue de 1 a 2 por cada 5000 células sembradas en las placas de cultivo (35 mm) y se estimó que los focos contenían entre 2 a 10 de estas células "alargadas-multinucleadas". Además, estas células se contraían espontáneamente. Indicando entonces que estas células adquirieron el fenotipo de miotubos. Conjuntamente, mediante análisis por RT-PCR se determinó que las células expuestas al inductor miogénico aumentaron 5 veces la expresión del marcador temprano de diferenciación miogénica MyoD, como se muestra en la figura 4. **Estos resultados confirman que las células adherentes obtenidas de la MO de rata contienen progenitores que pueden dar origen al**

menos a células de los linajes osteogénico, adipogénico y miogénico, característica funcional de las CTM.

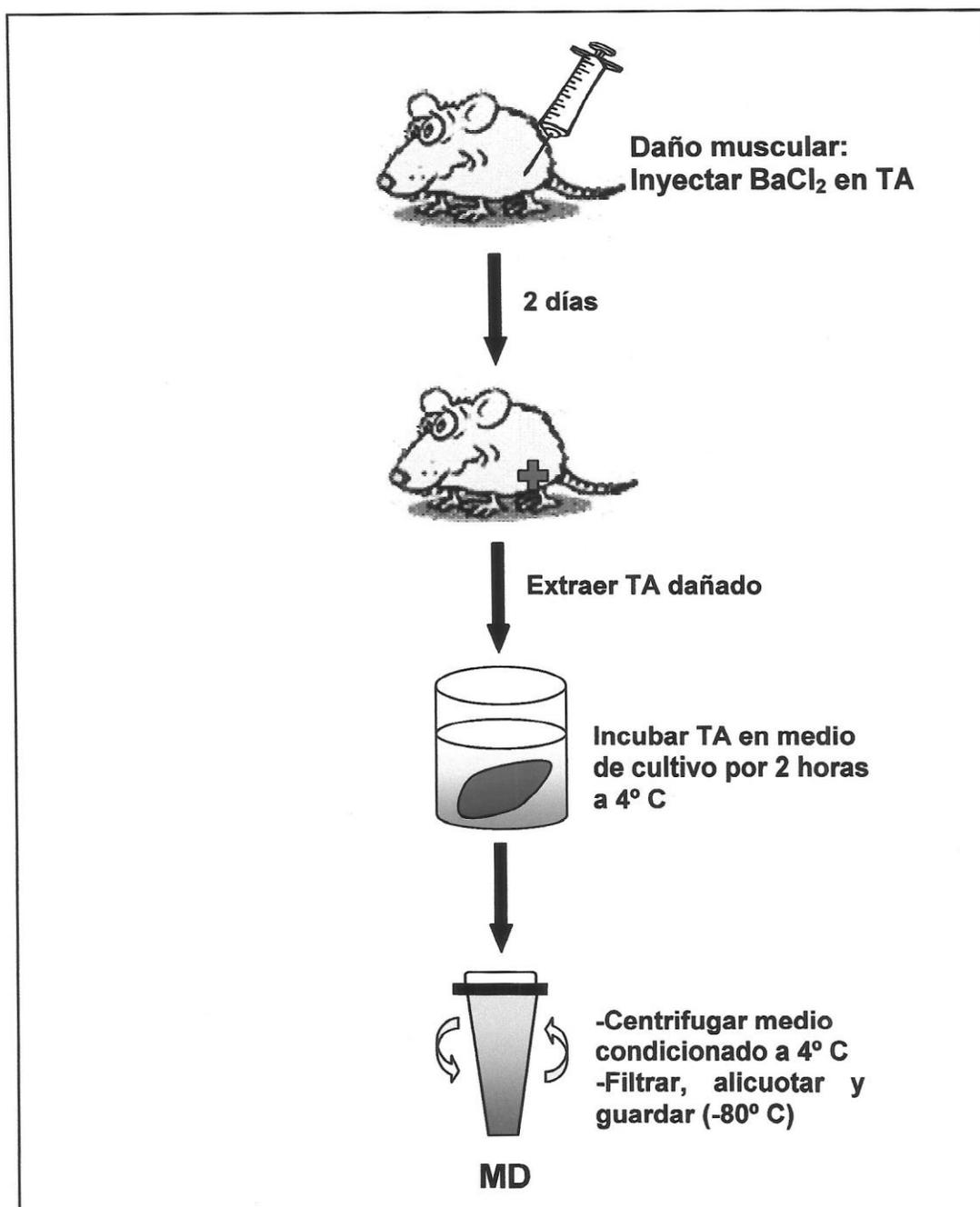
## 1.2 Obtención del medio condicionado por músculo esquelético dañado

Con el objetivo central de investigar si factores derivados del músculo dañado son capaces de inducir la diferenciación miogénica de las CTMr, se colectó el medio condicionado por músculo esquelético de rata, dañado *in vivo* previamente. Para esto se implementó un modelo de daño muscular químico, ilustrado en la figura 5, que consistió en inyectar una solución de  $\text{BaCl}_2$  (1,2% p/v, 49mM) en el músculo *Tibialis Anterior* (TA) de rata, procedimiento descrito por Caldwell y cols., 1990. Dos o cuatro días después de realizado el daño, el TA fue escindido y depositado en medio de cultivo. Luego, el medio condicionado fue recuperado, centrifugado, filtrado y guardado en alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización. A este medio condicionado se le designó MD. Como control del modelo químico de daño, se implementó el modelo de daño de tipo mecánico descrito por Kami y cols., 1995. Éste consistió en dejar caer un peso sobre el TA de ratas anestesiadas. La preparación del medio condicionado fue realizada como se describió anteriormente y se le designó como MD-contuso. El medio condicionado control, designado MnD fue obtenido a partir de TA de rata no inyectada usando el mismo procedimiento descrito.



**FIGURA N° 4. EXPRESIÓN DE MyoD EN LAS CTMr INDUCIDAS A DIFERENCIAR HACIA LINAJE MIOGÉNICO**

Las CTMr fueron incubadas en medio completo solo o suplementado por 24 horas con el inductor de diferenciación miogénica 5-Azacitidina (5AzaC). Después de 4 días de cultivo, el RNA total fue aislado para análisis mediante RT-PCR de la expresión del RNAm de MyoD. Como control interno se amplificó cDNA de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).



#### FIGURA Nº 5. ESQUEMA DE OBTENCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO POR MUSCULO DAÑADO

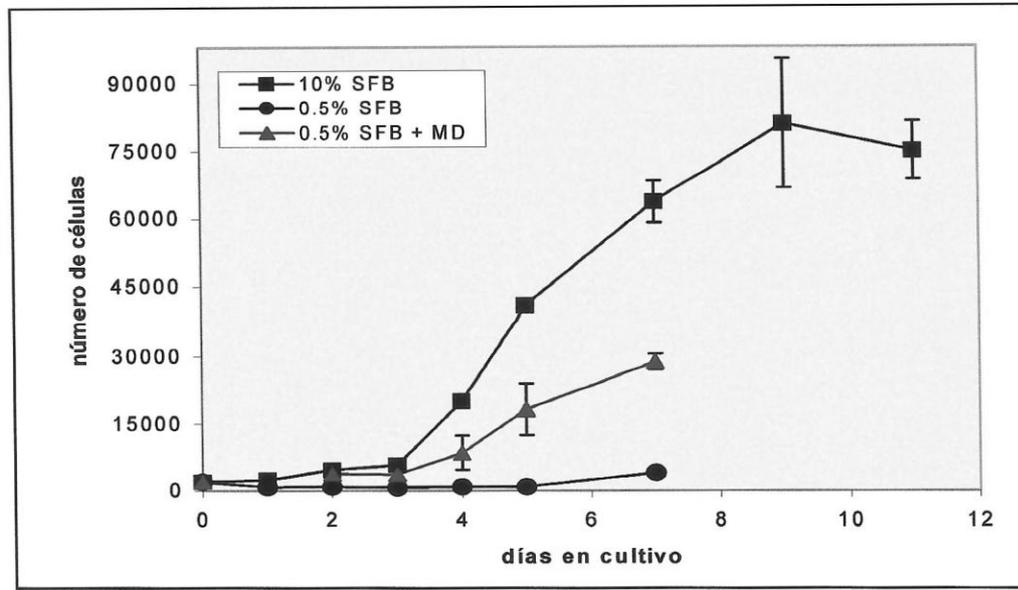
El daño muscular se realizó inyectando una solución de  $\text{BaCl}_2$  (1,2% p/v) en el músculo *tibialis anterior* (TA) de ratas adultas. Dos días después, el músculo dañado fue extraído y depositado en medio de cultivo por 2 horas a  $4^\circ\text{C}$  para condicionar el medio. Luego, el medio condicionado, denominado MD, fue centrifugado, filtrado, dividido en alícuotas y guardado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### 1.3 Efecto del medio condicionado obtenido a partir de músculo dañado (MD) sobre la morfología, proliferación y diferenciación miogénica de las CTMr

El efecto de MD sobre la proliferación de las CTMr fue estudiado al cultivar las células en medio conteniendo sólo 0,5% de SFB o suplementado con cantidades crecientes de MD. Como se mostró anteriormente en la Figura 3, las CTMr en medio conteniendo sólo 0,5% de SFB no proliferan. La Figura 6A muestra que en presencia de MD las células proliferan; sin embargo, al cabo de 7 días en estas condiciones (0,5 mg/ml de proteína), el cultivo alcanza el 40% del crecimiento de las CTMr mantenidas en medio con 10% de SFB. La Figura 6B indica que la proliferación es dependiente de la cantidad de proteínas aportada por el MD y con 0,5-1 mg/ml de proteína del MD alcanza una tasa de proliferación aproximadamente 12 veces respecto de las CTMr mantenidas en solo 0,5% de SFB. Mientras que en las CTMr incubadas con MnD, no se observó un efecto en la proliferación celular, independientemente de la dosis de MnD usada. **Estos resultados indican que desde el músculo esquelético que ha sido dañado se liberan al medio factor(es) que estimulan la proliferación de las CTMr.**

La Figura 7 muestra el curso temporal del efecto de MD sobre el cambio morfológico de las CTMr. Antes de la exposición al MD, las CTMr en cultivo mostraban la morfología del tipo fibroblastoide característica (Fig. 7A), que se mantenía luego que las células habían sido cultivadas con MD (0,5 mg/ml de proteína) por 2 días (Fig. 7B). A tiempos posteriores, conjuntamente con un aumento en el número de células, fueron evidentes cambios en la morfología celular. Entre los 4 a 5 días de incubación con MD eran observables algunas células poligonales pequeñas (Fig. 7C) y desde los 6 a 7 días en adelante, fueron notorios varios focos conteniendo entre 5 a

A



B

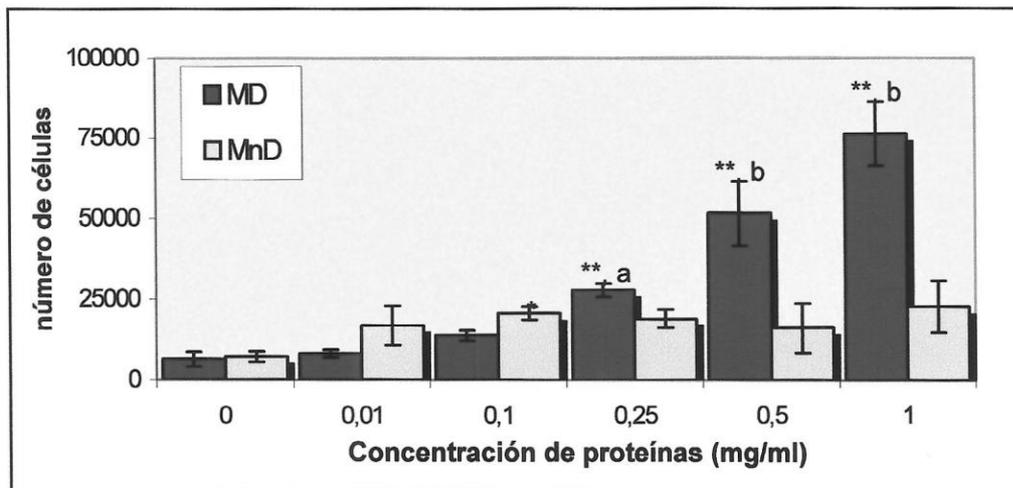
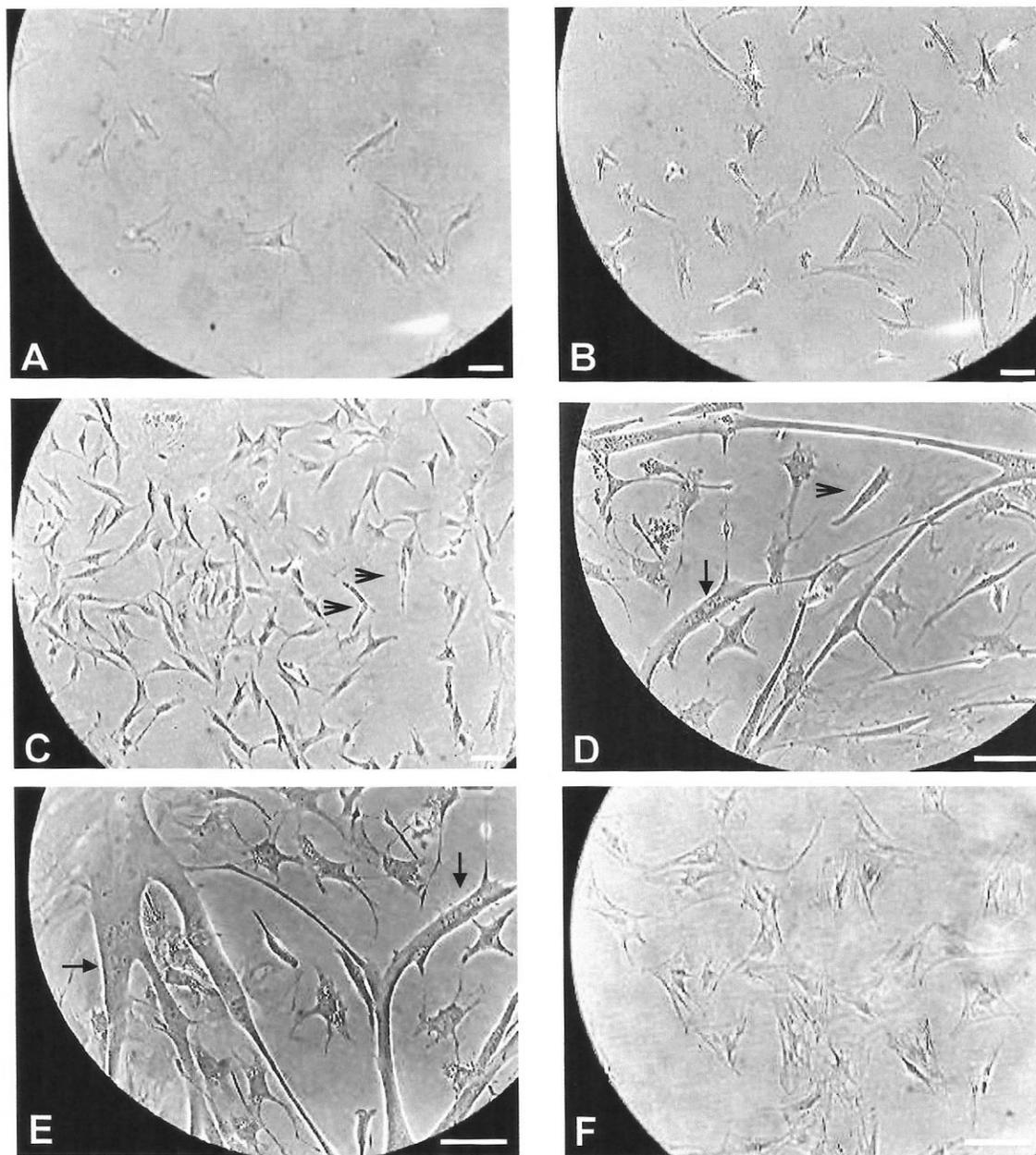


FIGURA Nº 6. EFECTO DEL MD SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CTMr. (A) Las células fueron sembradas a una densidad de 1000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo conteniendo 10% de SFB o 0,5% de SFB solo (control) o suplementado con 0,5 mg/ml de proteína de MD. A cada intervalo de tiempo se evaluó el número de células viables. (B) Las células fueron sembradas a una densidad de 1500 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB suplementado con MD o MnD a la concentración de proteína indicada. A los 7 días, las células viables fueron contadas. Los datos representan el promedio del número de células ± la desviación estándar de tres experimentos realizados en triplicado. Asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (sin MD\*\* o MnD\*),  $p < 0,05$ ; letras distintas señalan diferencias significativas en el número de CTMr con respecto de la dosis de MD,  $p < 0,05$ .

15 células grandes, alargadas y multinucleadas (Fig. 7D, E), similares a las observadas luego de exponer las CTMr a la 5-azacitidina. Notoriamente, estas células también presentaban contracciones espontáneas. Dado que el número de focos de este tipo de células fue mayor al incubar con MD obtenido de músculo escindido 2 en vez de 4 días después de realizado el daño, se optó por remover los músculos dañados a los 2 días de la inyección de BaCl<sub>2</sub>. En contraposición, las células incubadas con MnD (0,5 mg/ml de proteína) mostraron durante todo el periodo del ensayo una morfología similar a las células incubadas en medio con 0,5% de SFB, tal como se observa en la Figura 7F. **Estos resultados mostraron que el MD induce la formación de células con características morfológicas y funcionales propias de una célula muscular.**

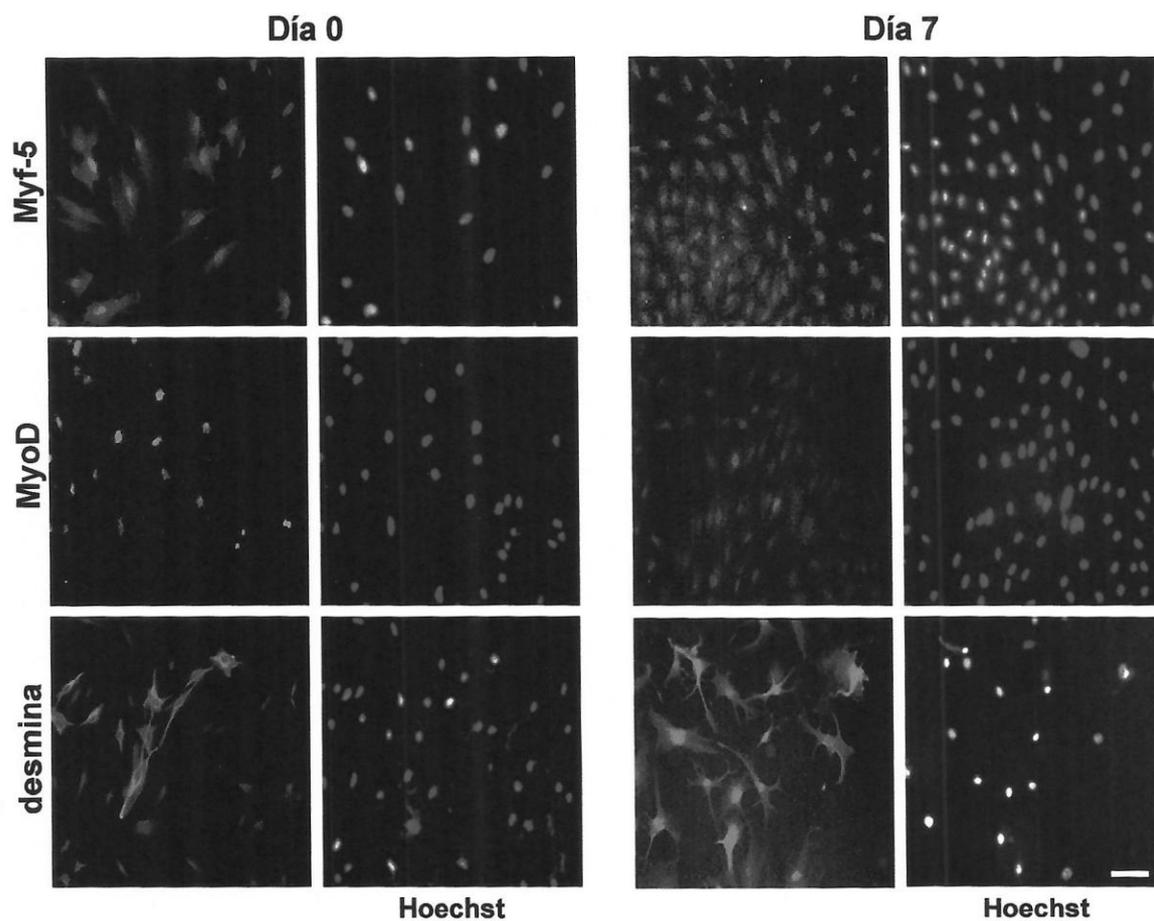
Las modificaciones en la morfología de las CTMr tratadas con MD fueron acompañadas de cambios en la expresión de proteínas marcadoras miogénicas. La Figura 8 muestra que, tanto en condiciones de cultivo control (0,5% de SFB), como en medio de cultivo completo (10% de SFB), las CTMr expresaban los marcadores de diferenciación miogénica temprana MyoD, Myf-5 y desmina. Esto fue observado en el 2%, 80% y 5% de las células para MyoD, Myf-5 y desmina, respectivamente (Figura 8). Sin embargo, las células no estimuladas no expresaban proteínas marcadoras de estados de diferenciación intermedia y tardía, como miogenina,  $\alpha$ -actinina y cadena pesada de la miosina (MHC). Por otra parte, las CTMr mostraron variaciones en la expresión de los marcadores miogénicos MyoD, miogenina,  $\alpha$ -actinina y MHC en el transcurso de la exposición al MD (Tabla 1). Después de 2 días de cultivo con MD, el número de las células positivas para la expresión de MyoD aumentó desde un 2% hasta un 40-60%, como muestra la Figura 9, mientras que la expresión de los otros marcadores

miogénicos permanecía invariable (Tabla I). Este efecto del MD en la expresión de MyoD fue además validado por análisis mediante RT-PCR, el cual mostró que la abundancia de los transcritos de MyoD fue 10 veces superior en aquellas células expuestas a MD que en células control (Fig. 9B). Sin embargo, el aumento del número de células positivas para MyoD fue transitorio, puesto que luego de 3-4 días en presencia de MD, el porcentaje de las células MyoD positivas retornó a los niveles del control (Fig. 9 y Tabla I). Entre los días 4-5, cuando las células eran aún mononucleadas, se detectó miogenina en aproximadamente el 2% de las células, mientras que el resto de los marcadores miogénicos no registró cambio (Myf-5, MyoD,  $\alpha$ -actinina y miosina). Desde los días 6-7 en adelante, más del 90% de las células mostró expresión de desmina (Fig. 8). Además, los focos de células alargadas y multinucleadas (como los ilustrados en la Figura 7) expresaban miogenina,  $\alpha$ -actinina y MHC en aproximadamente el 2-3% del total de células, estimado a partir de los núcleos contados en la lámina (Figura 10). Cabe mencionar que las CTMr incubadas con MnD no mostraron aumento en la expresión de MyoD; tampoco hubo expresión de marcadores miogénicos intermedios ni tardíos, durante todo el periodo de análisis. Por lo tanto, los resultados hasta aquí expuestos demuestran que el medio condicionado por músculo dañado químicamente con  $\text{BaCl}_2$  contiene algún o algunos factores que inducen la diferenciación miogénica de las CTMr.



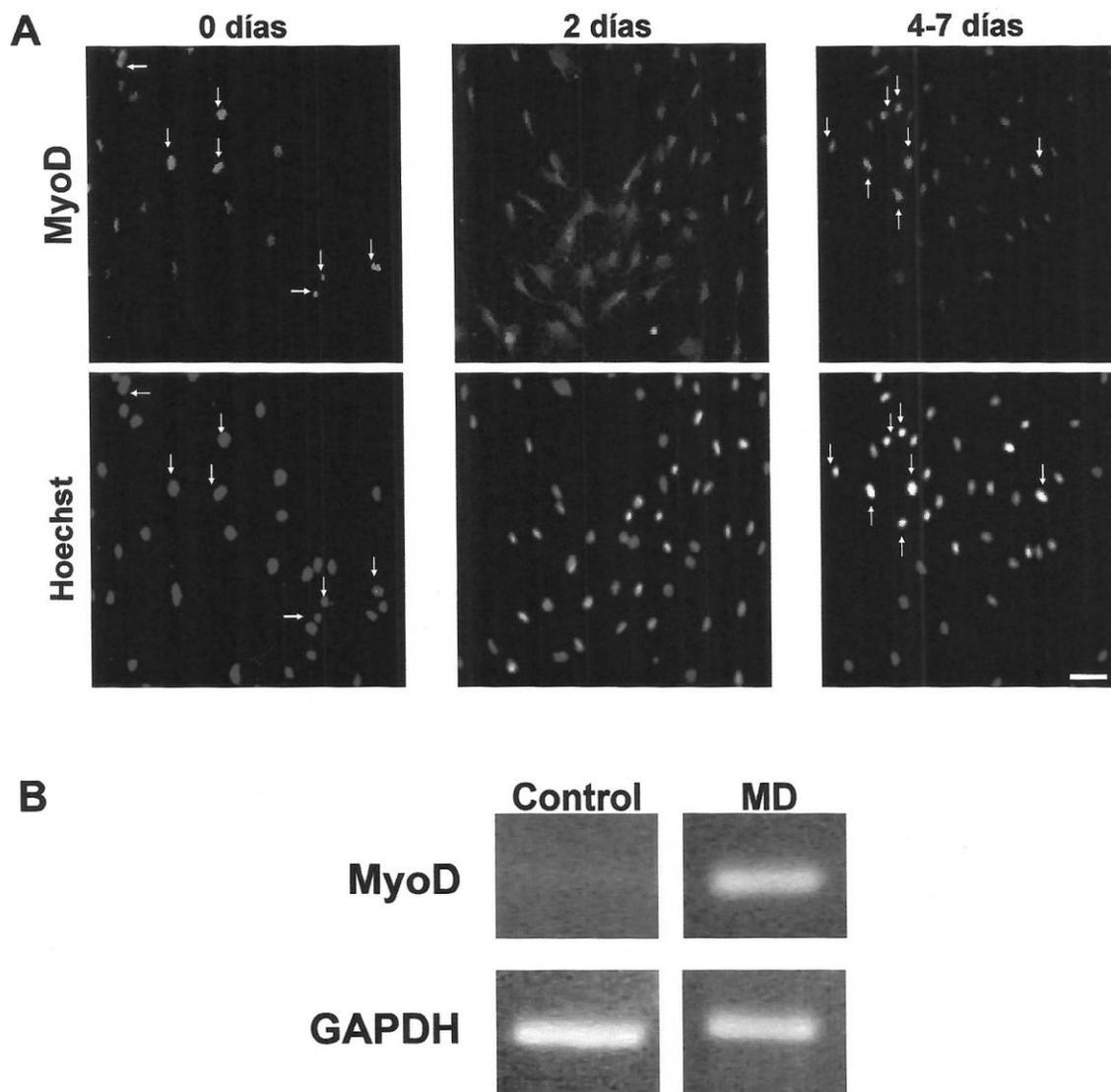
#### FIGURA N° 7. EFECTO DEL MD SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS CTMr

Las células fueron sembradas a una densidad de  $1000 \text{ células/cm}^2$  e incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB suplementado con MD (0,5 mg/ml). Las fotografías obtenidas desde el microscopio de contraste de fase fueron tomadas a los 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D) y 12 días (E) de cultivo. La cabeza de flecha y la flecha muestran células poligonales pequeñas y grandes células alargadas y multinucleadas, respectivamente. (F) señala las CTMr incubadas por 12 días con MnD en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB. Estos resultados son representativos de al menos 5 experimentos independientes. La escala de la barra representa  $50 \mu\text{m}$ .



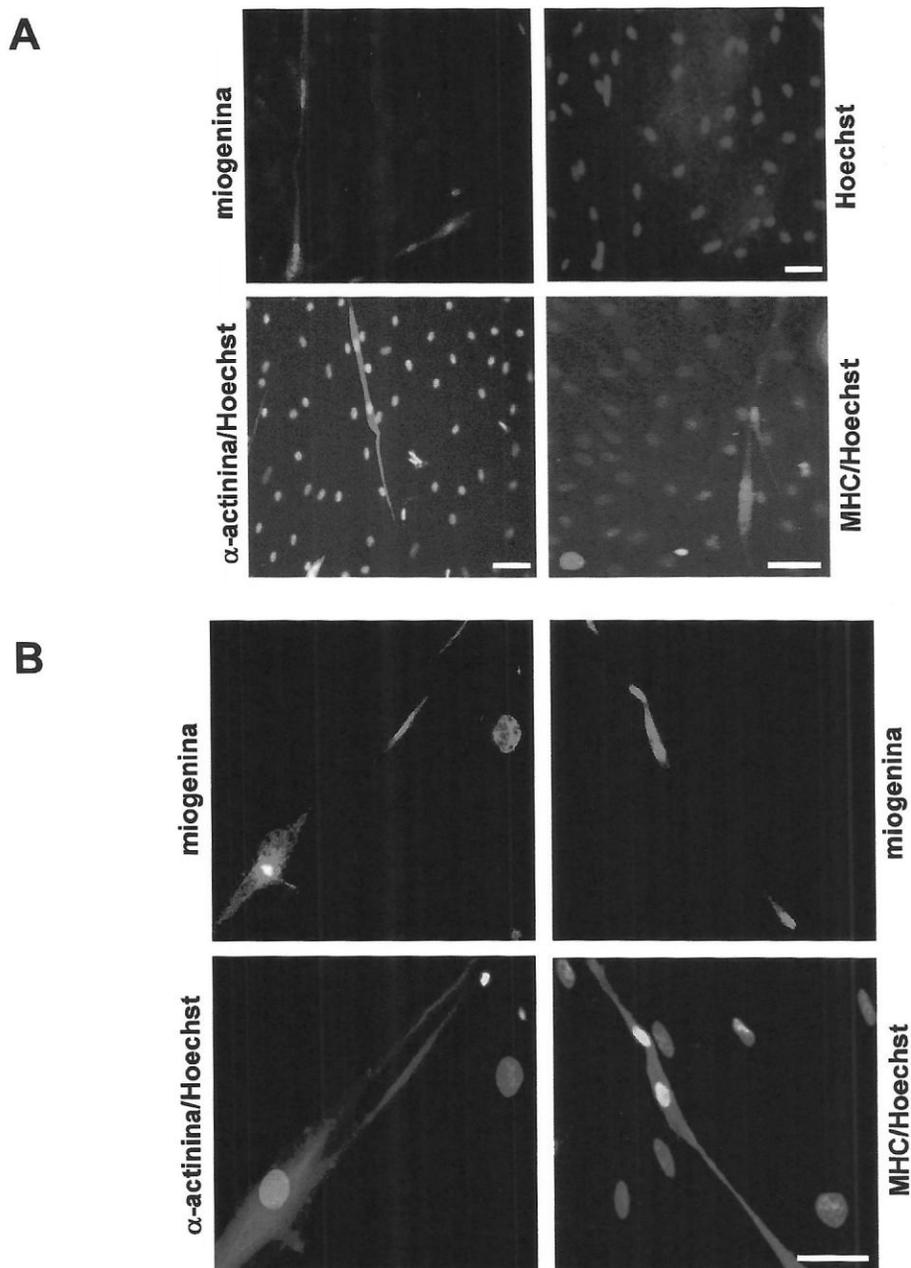
**FIGURA 8. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACION MIOGÉNICA TEMPRANA EN CTMr INCUBADAS CON MD.**

Las células sembradas a una densidad de 1000 células/cm<sup>2</sup> fueron incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB y 0,5 mg/ml de MD. A los días 0 y 7, la expresión de Myf-5, MyoD y desmina fue determinada por análisis de inmunofluorescencia (paneles del lado izquierdo). La tinción con Hoechst (paneles del lado derecho) confirma la localización nuclear de la señal inmuofluorescente. Los resultados son representativos de al menos 5 experimentos independientes. La escala de la barra representa 50  $\mu$ m.



**FIGURA 9. EXPRESION DE MyoD EN LAS CTMr EXPUESTAS A MD.**

(A) Aumento transitorio de la expresión de MyoD en las CTMr expuestas a MD. Las células sembradas a una densidad de 1000 células/cm<sup>2</sup> fueron incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB y 0,5 mg/ml de MD. La expresión de MyoD fue ensayada a los 0, 2 y 4-7 días de cultivo mediante inmunofluorescencia. La tinción con Hoechst confirma la localización nuclear de la señal inmunofluorescente. Las flechas indican los núcleos positivos para MyoD a los 0 y 4-7 días. La escala de la barra representa 50  $\mu$ m. (B) Análisis de la expresión de MyoD mediante RT-PCR. Las CTMr fueron incubadas en medio control (0,5% de SFB) y en medio control suplementado con 0,5 mg/ml de MD. Después de 3 días, el RNA total fue aislado para análisis de la expresión del RNAm de MyoD mediante RT-PCR. Como control interno se amplificó cDNA de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).



**FIGURA 10. EXPRESIÓN DE MARCADORES MIOGÉNICOS INTERMEDIOS Y TARDÍOS EN CTMr INCUBADAS CON MD.**

Las células fueron sembradas a una densidad de 1000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo con 0,5% de SFB y suplementado con 0,5 mg/ml de MD. (A) Expresión de miogenina,  $\alpha$ -actinina y miosina (MHC) ensayada a los 7 días de cultivo. (B) Doble inmunofluorescencia para miogenina y  $\alpha$ -actinina o miosina (MHC) a los 12 días de incubación con MD. Localización nuclear de la inmunofluorescencia confirmada por tinción con Hoechst. Resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. La barra representa 50  $\mu$ m.

TABLA 1. Resumen de los cambios en la expresión de los marcadores miogénicos inducidos por el MD en las CTMr.

Días en cultivo	Myf-5	MyoD	desmina	miogenina	$\alpha$ -actinina	MHC
0 <sup>1</sup>	+++	+	+	-	-	-
2-3	+++	++	n.d.	-	-	-
4-6	+++	+	++	+	-	-
7-12	++	+	+++	+	+	+
miotubos <sup>2</sup>	n.d.	++	+++	+++	+++	+++

Las células fueron agrupadas en las siguientes categorías según la expresión relativa de cada marcador detectado mediante inmunofluorescencia:

+++ :  $\geq 90\%$

++ : 40% a 60%

+ :  $< 10\%$

- : negativo

n.d.: no determinado.

Los porcentajes fueron determinados respecto del número total de núcleos contados en la lámina.

<sup>1</sup> Ensayado 24 horas después de sembrar.

<sup>2</sup> Similares a aquellos mostrados en la figura 5D y E

### 1.3.1 *Caracterización por citometría de flujo de la diferenciación miogénica de las CTMr incubadas con MD*

Con el propósito de tener otra herramienta para la cuantificación del efecto provocado por el MD en las CTMr, se analizó por citometría de flujo la expresión de marcadores de diferenciación miogénica. Para esto, las CTMr fueron incubadas en medio conteniendo 0,5% de SFB suplementado con MD (0,5 mg/ml) por 7 días. Las células fueron tratadas con los anticuerpos contra las proteínas marcadoras de diferenciación miogénica (MyoD, Myf-5 y MHC o miosina) y con yoduro de propidio. Esto último para inferir el estado de ciclo de las células marcadas a partir de la medición del contenido de DNA.

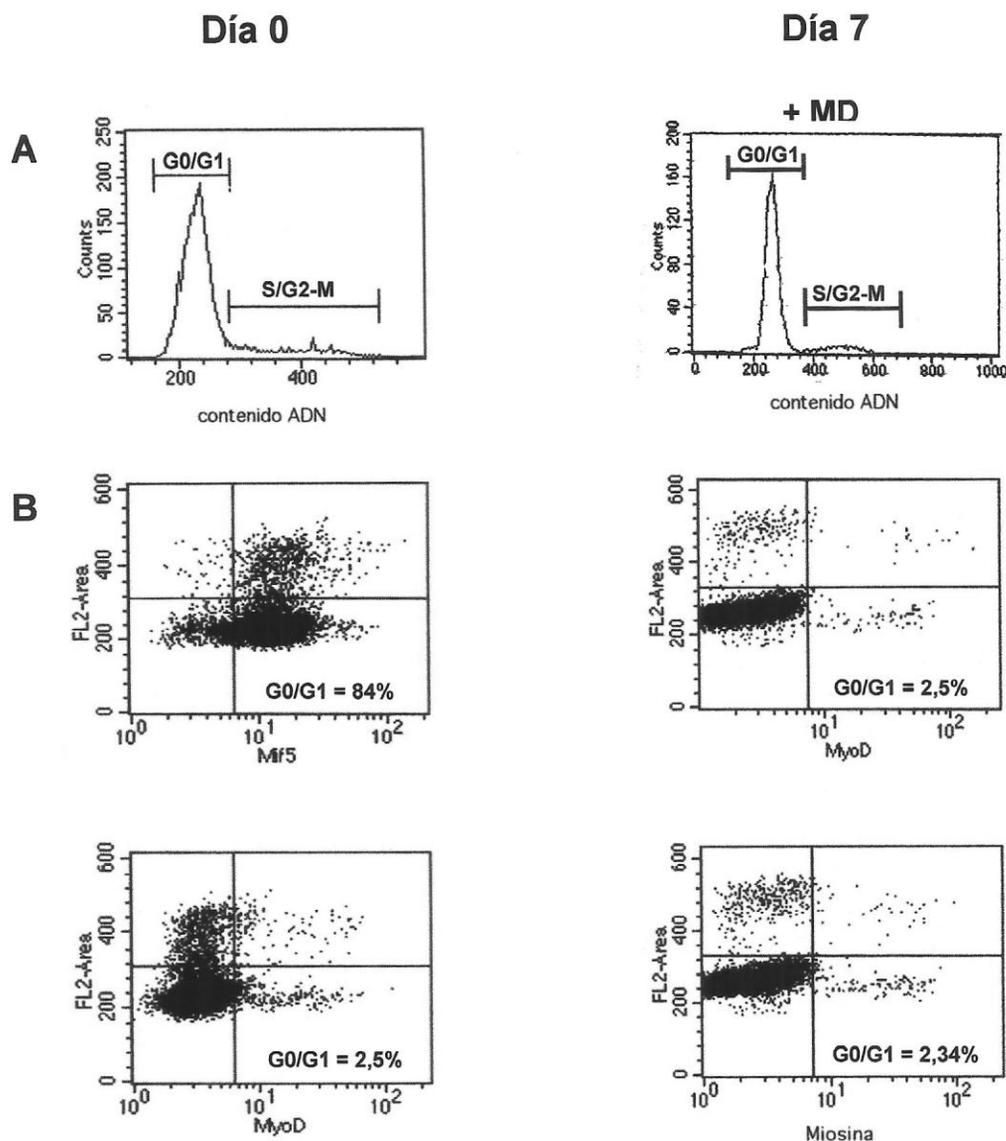
El análisis de los datos obtenidos de la citometría de flujo (Figura II), indican que, al inicio de los ensayos (día 0), el 90% de las células se encontraban en etapa G0/G1 del ciclo celular. De estas células, el 2,5% es positivo para MyoD y el 84% resultó positivo para la expresión de Myf-5. El 10% de las células restantes, que estaban en las etapas S y G2/M, eran todas positivas para Myf-5 y sólo un 0,8% era también positivo para MyoD. Por otra parte, todas las células fueron negativas para miosina al día 0. Al cabo de 7 días de cultivo con MD, en aquellas CTMr que estaban en etapa G0/G1 (90%), se detectó MyoD, Myf-5 y MHC en el 2,50%, 70% y 2,34% de las células, respectivamente. Mientras que todas las células que estaban en etapa S y G2/M expresaban Myf-5, un 0,63% de ellas eran positivas para MyoD. Cabe mencionar que las CTMr incubadas por 7 días bajo condición control (0,5% de SFB) se encontraban en un 90% en las etapas G0/G1, en concordancia con el hecho que las células bajo estas

condiciones no proliferan (Fig. 3 y Fig. 6A) y no se detectó la expresión de MyoD, ni MHC.

Estos datos apoyan los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, revelando que aproximadamente entre el 2 a 3% del total de las células expuestas durante 7 días a MD corresponden a células diferenciadas hacia el linaje miogénico.

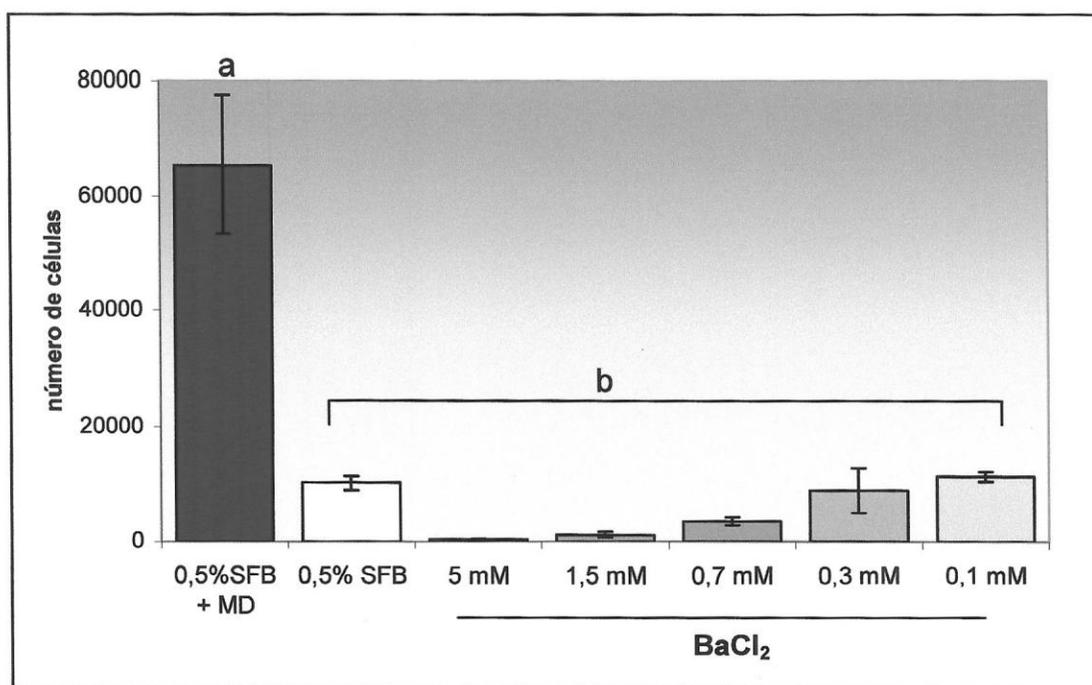
### 1.3.2 *Análisis para demostrar que el BaCl<sub>2</sub> residual no es responsable del efecto miogénico atribuido a MD*

La posibilidad que el efecto miogénico observado fuese atribuible a BaCl<sub>2</sub> residual en el MD fue analizado en ensayos que demostraron que las CTMr cultivadas en presencia de BaCl<sub>2</sub> en concentraciones entre 0,1 y 5 mM, no exhibieron proliferación (Fig. 12), ni cambios en su inmunofenotipo. Por el contrario, el BaCl<sub>2</sub> resultó letal en concentraciones mayores a 0,1 mM.



**FIGURA II. CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS CTMr INCUBADAS CON MD**

Las células fueron sembradas en medio con 10% de SFB (Día 0) e incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB solo (control) o suplementado con 0,5 mg/ml de proteína de MD por 7 días. Las células fueron tratadas con los anticuerpos contra las proteínas marcadoras de diferenciación miogénica (Myf-5, MyoD y miosina) y con yoduro de propidio. **A.** Histogramas del estado de ciclo de las CTMr. **B.** Gráficos de densidad que relacionan contenido de DNA con la marcación de diferenciación miogénica en las células, a los días 0 y 7. Valores indican el porcentaje del total de células marcadas en etapa G0/G1. Al día 7 en las CTMr control no se detectó la expresión de MyoD, ni miosina. Los datos son representativos de 2 experimentos.



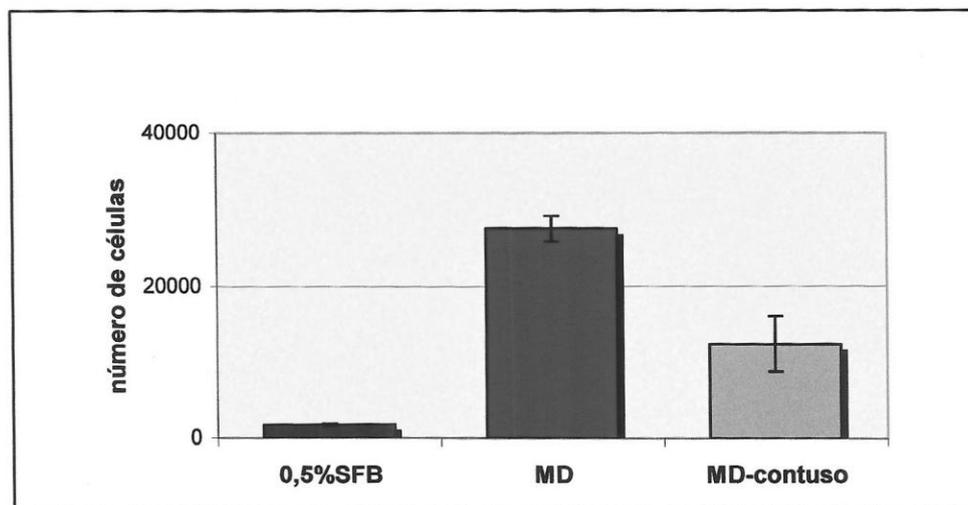
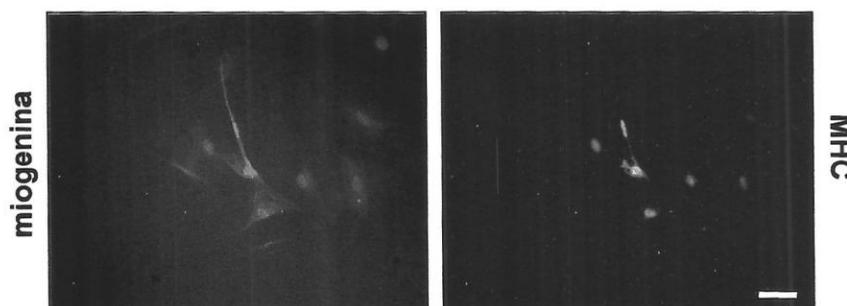
**FIGURA 12. EFECTO DE BaCl<sub>2</sub> SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CTMr**  
Las células fueron sembradas a una densidad de 5000 células /cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo con 0,5 % de SFB suplementado con 0,5 mg/ml de MD o con BaCl<sub>2</sub> en las concentraciones indicadas. Después de 7 días en cultivo en las respectivas condiciones, las células viables fueron contadas. Los datos representan el promedio del número de células ± la desviación estándar de 2 experimentos realizados por triplicado. Letras distintas denotan diferencias significativas, p < 0,001.

### 1.3.3 Efecto miogénico del medio condicionado por músculo dañado mecánicamente (MD-contuso) en las CTMr

Con el propósito de independizar los efectos observados del mecanismo de generación del daño muscular, se analizó las consecuencias de cultivar las CTMr con medio condicionado obtenido a partir de músculo dañado *in vivo* por contusión.

Las CTMr fueron incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB solo o suplementando con distintas cantidades de proteína de MD-contuso. La Figura 13A muestra que en presencia de MD-contuso las células aumentaron su proliferación 12 veces en comparación al control. Este efecto fue dependiente de la dosis de MD-contuso en el cultivo (no mostrado). Sin embargo, el efecto proliferativo de MD-contuso fue un 50% menor que el producido por igual cantidad de proteínas de MD.

El aumento de entre un 20 a un 30% en el número de CTMr que expresaban MyoD luego de incubar con una concentración de 0,8 mg/ml de proteína de MD-contuso, mayor que la usada para incubaciones con MD (0,5 mg/ml de proteína) durante 2 días, sugirió un efecto similar al causado por MD (no mostrado). Sin embargo, en las CTMr expuestas durante 10 días a MD-contuso (0,8 mg/ml de proteína), no se observaron grandes focos de células alargadas y multinucleadas, sino que sólo se detectaron células discretas que expresaban miogenina y miosina (Fig. 13B). Estos resultados indican que el efecto de MD-contuso sobre las CTMr fue cualitativamente similar, aunque cuantitativamente inferior, al producido por MD. De manera que el medio condicionado por músculo esquelético dañado, química o mecánicamente, contiene señales que estimulan la diferenciación miogénica de las CTMr.

**A****B**

**FIGURA Nº 13. EFECTO DE MD-contuso SOBRE LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS CTMr.**

Las células fueron sembradas a una densidad de 1000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo con 0,5% de SFB solo, suplementado con 0,5 mg/ml de MD o con 0,5 mg/ml de MD-contuso. (A) Al cabo de 7 días en cultivo, las células viables fueron contadas. Los datos representan el número promedio de células  $\pm$  la desviación estándar de un experimento realizado en triplicado. (B) Inmunofluorescencia doble con anticuerpos contra miogenina y MHC realizada después de 10 días de incubación con 0,8 mg/ml de MD-contuso. La barra representa 50  $\mu$ m.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE FACTORES EN EL MEDIO CONDICIONADO RESPONSABLES DE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS CTM<sub>r</sub>

Con la finalidad de iniciar la identificación de los factores solubles provenientes del tejido muscular dañado, que son responsables de la inducción de la diferenciación miogénica y del estímulo de la proliferación, se analizó la especificidad celular del MD para inducir respuestas miogénicas en otras células, su estabilidad térmica y el tamaño molecular de los componentes responsables de los referidos efectos.

### 2.1 Efecto del MD sobre otras líneas y cultivos celulares

Para esto se utilizaron líneas celulares o cultivos primarios de progenitores miogénicos de otro origen y de células no miogénicas de murino y humano. Estas se incubaron por diferentes periodos en medio de cultivo con 0,5% de SFB solo o suplementado con MD (0,5 mg/ml). En el transcurso de la incubación se evaluó: morfología, viabilidad celular y la expresión de los marcadores miogénicos MyoD, Myf-5, miogenina,  $\alpha$ -actinina y miosina. Las células utilizadas fueron: mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, (una línea celular de células satélite derivada de músculo esquelético de ratón), células MCF-7 (línea derivada de epitelio mamario humano), fibroblastos 3T3 (línea celular mesenquimática derivada de embrión de ratón), fibroblastos de piel humana y CTM de médula ósea humana.

Los resultados de las Figuras 14 y 15 muestran que el MD estimuló la proliferación en todos los tipos celulares estudiados: MCF-7, 3T3, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, fibroblastos de piel humana y CTM humanas. La morfología de las células después de incubar con MD,

tal como lo exhibe la Figura 14, no fue diferente de la exhibida en la respectiva condición control (con 0,5% de SFB). En cambio, de manera análoga a lo descrito en este trabajo para las CTMr, el MD produjo una evidente diferenciación miogénica de los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, equivalente a la resultante de su incubación en presencia de 4% de SC, su medio de diferenciación convencional (Fig. 15, panel inferior). En respuesta al MD los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> formaron numerosos focos de miotubos, grandes (largos y gruesos) y ramificados, antes incluso que los formados en su medio de diferenciación convencional y claramente distinguibles de aquellos escasamente presentes en condiciones de 0,5% de SFB, que además de escasos son cortos y delgados (Fig. 15 panel inferior). Estas observaciones fueron además confirmadas por la expresión de los marcadores de diferenciación miogénica, miogenina y miosina. Esta última, fue detectada en más del 60% de las células en cultivo con MD (Fig. 16). Los marcadores detectados en las CTMr y en los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> expuestos al MD, pero no en los otros tipos de células en estudio están resumidos en la Tabla II.

Estos resultados sugieren que el efecto proliferativo producido por componentes del MD es inespecífico, mientras que el efecto miogénico parece ser específico para células con el potencial de diferenciar hacia el linaje muscular.

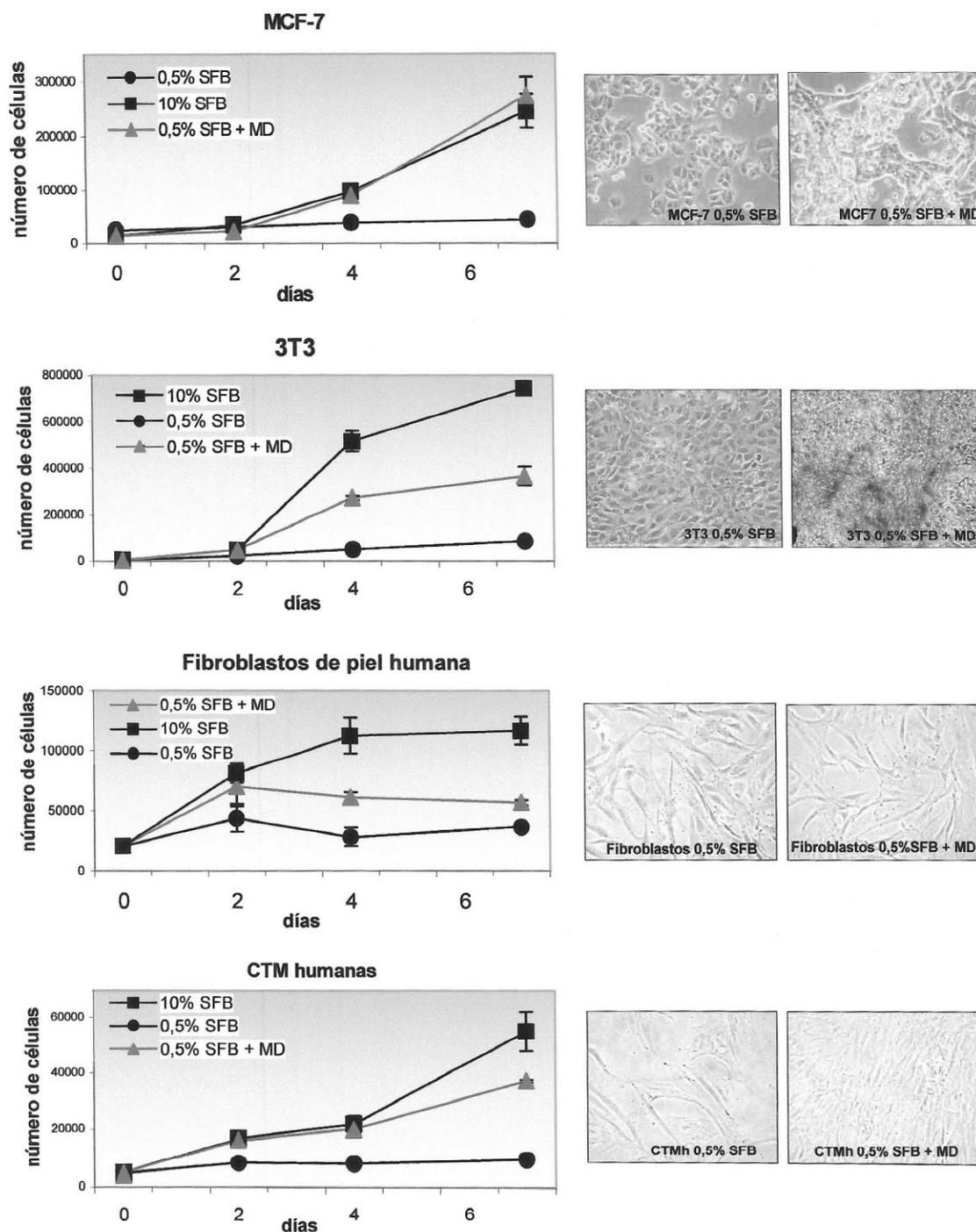
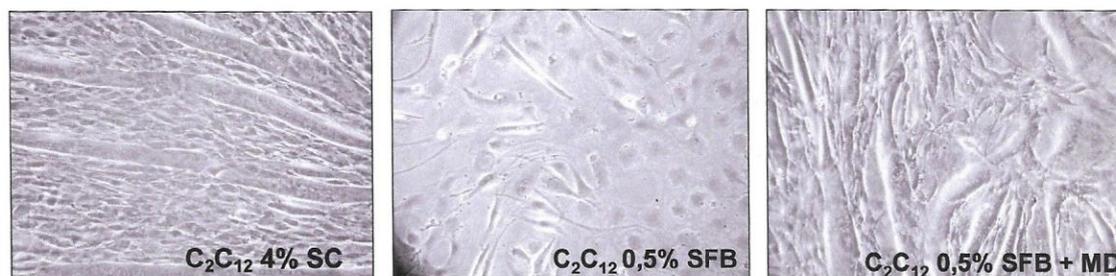
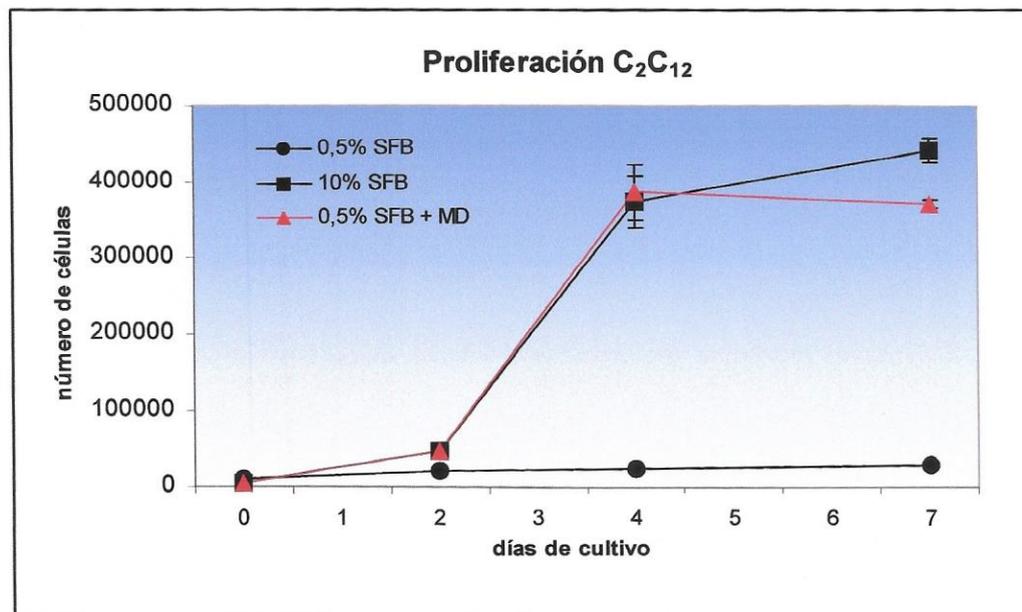


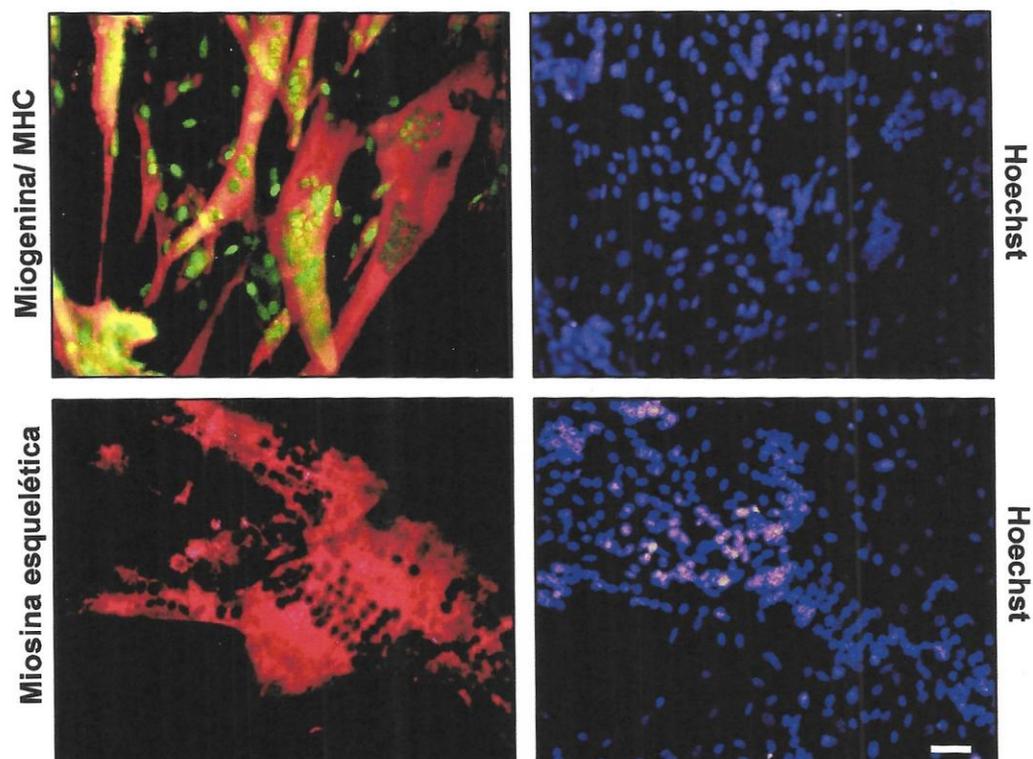
FIGURA N<sup>o</sup> 14. EFECTO DEL MD SOBRE LA PROLIFERACION Y MORFOLOGÍA DE CELULAS DIFERENTES A LAS CTMr.

Las líneas celulares MCF-7, 3T3 y cultivos de fibroblastos de piel y de CTM humanas se incubaron en medio de cultivo con 10% o 0,5% de SFB (control) o suplementado con 0,5 mg/ml de MD. A cada intervalo de tiempo se evaluó morfología y viabilidad celular (panel izquierdo). El panel derecho muestra la morfología de las células luego de 7 días de cultivo en la condición control o con MD.



**FIGURA Nº 15. EFECTO DEL MD SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA MORFOLOGÍA DE MIOBLASTOS  $C_2C_{12}$**

Los mioblastos  $C_2C_{12}$  fueron sembrados a una densidad de 3000 células/cm<sup>2</sup> e incubados en medio de cultivo D-MEM conteniendo 10% o 0,5% de SFB solo (control) o suplementado con 0,5 mg/ml de proteína de MD. A cada intervalo de tiempo se evaluó el número de células viables (panel superior). Los datos representan el promedio del número de células  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos hechos en triplicado. El panel inferior muestra la morfología de las células luego de 7 días de cultivo en la condición de diferenciación convencional para las  $C_2C_{12}$  (4% SC), condición control o con MD.



**FIGURA Nº 16. EFECTO DE MD SOBRE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LOS MIOBLASTOS  $C_2C_{12}$ .**

Los mioblastos  $C_2C_{12}$  fueron sembrados a una densidad de 3000 células/cm<sup>2</sup> e incubados en medio de cultivo D-MEM con 0,5% de SFB suplementado con 0,5 mg/ml de MD. La expresión de miogenina, miosina (MHC) y miosina esquelética fue ensayada a los 7 días de cultivo. La localización nuclear de la miogenina fue confirmada por tinción de los núcleos con Hoechst. La escala de la barra representa 50  $\mu$ m.

TABLA 2. Expresión de marcadores miogénicos en distintas líneas celulares y cultivos primarios a los 7 días en cultivo con MD

Tipo celular	MyoD	Myf5	miogenina	$\alpha$ -actinina	MHC
CTM rata	+	+++	+	+	+
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	+++	+++	+++	+++	+++
MCF-7	-	-	-	-	-
3T3	-	-	-	-	-
fibroblastos de piel humana	-	-	-	-	-
CTM humanas	-	+++	-	-	-

Analizado por inmunofluorescencia. Células fueron agrupadas en las siguientes categorías:

+++ :  $\geq 50\%$

+:  $< 5\%$

-: negativo

Porcentaje asignado con respecto al total de núcleos celulares en la lámina.

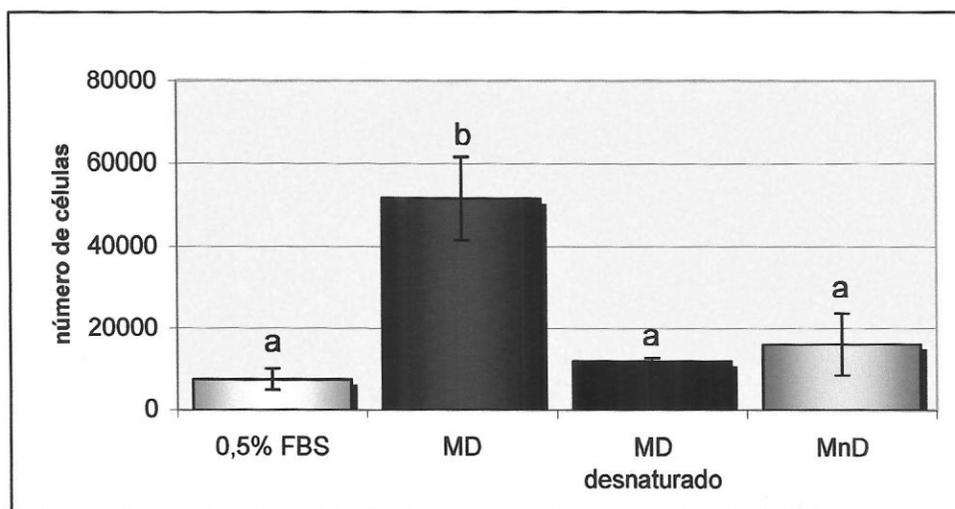
## 2.2 Estabilidad térmica de componentes del MD que estimulan la proliferación y la diferenciación miogénica de CTMr

El MD fue sometido a desnaturación térmica, calentando por 7 minutos a 95° C. Con este MD desnaturado, se suplementó el medio control (con 0,5% de SFB) utilizado para cultivar las CTMr. La Figura 17 muestra que el MD desnaturado perdió la capacidad de estimular la proliferación de las CTMr, teniendo un efecto similar al MnD o al medio de cultivo con solo 0,5% de SFB. El MD sometido a desnaturación tampoco produjo cambios en la morfología de las células ni en el nivel de expresión de MyoD. Además, MD desnaturado no indujo la expresión de miogenina,  $\alpha$ -actinina o miosina. Por tanto estos datos apoyan la noción que los factores del MD que afectan la proliferación y diferenciación miogénica de las CTMr serían de naturaleza proteica.

## 2.3 Análisis de las proteínas componentes del MD

El análisis de las proteínas del MD y del MnD se realizó mediante electroforesis desnaturante en geles unidimensionales en gradiente de concentración de poliacrilamida. La Figura 18A muestra la fotografía de un gel representativo que revela diferencias cualitativas y cuantitativas en el patrón de proteínas del MD y del MnD (asteriscos, Fig. 18).

Se observó que el número de bandas proteicas que componen el MD, visualizadas a partir de la tinción con nitrato de plata, es aproximadamente de 15 y su tamaño molecular aparente abarca desde los 15 hasta los 160 KDa. También se observó que la mayoría de las bandas polipeptídicas presentes en el MnD se intensifican en el



**FIGURA Nº 17. LA ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE LA PROLIFERACIÓN PRESENTE EN EL MD ES TERMOSENSIBLE**

Las CTMr fueron sembradas a una densidad de 1500 células/cm<sup>2</sup> e incubadas por 7 días en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB solo o suplementado con 0,5 mg/ml de MD, de MD sometido a desnaturalación térmica o de MnD. A los 7 días, las células viables fueron contadas. Datos representan el número promedio de células  $\pm$  la desviación estándar de 2 experimentos realizados en triplicado. Letras distintas denotan diferencias significativas,  $p < 0,001$ .

MD, pero también aparecen nuevas bandas entre los tamaños de 90 a 160 kDa, cercano a los 50 kDa y una cercana a los 25 kDa. Además, el patrón de proteínas de MD obtenido de distintos músculos es idéntico, revelando reproducibilidad en la obtención de medio condicionado. En la Figura 18B se observa que el perfil de proteínas del MD en los geles teñidos con nitrato de plata no fue muy diferente de lo observado en los geles teñidos con azul de coomasie, lo que sería indicativo de un perfil de proteínas poco complejo.

#### **2.4 Caracterización de las proteínas presentes en el MD mediante filtración a través de tamices moleculares**

En un intento por aislar e identificar el o los factores del MD responsables del efecto en la diferenciación hacia linaje miogénico de las CTMr, se fraccionó el MD filtrando a través de membranas que retienen proteínas de tamaño molecular nominal límite de 50 kDa (Fig. 19A). Las proteínas retenidas denominadas fracción del MD de alto tamaño molecular (MD-A) y las proteínas filtradas denominadas fracción del MD de bajo tamaño molecular (MD-B), fueron analizadas mediante electroforesis en condiciones desnaturalantes, como se señala en el siguiente punto.

##### *2.4.1 Análisis de las proteínas presentes en las fracciones MD-A y MD-B*

El análisis de las proteínas que componen las fracciones del MD fue realizado primeramente mediante electroforesis en gradiente de poliacrilamida seguida de tinción con nitrato de plata. La Figura 19 muestra que el perfil de proteínas de la fracción MD-A resultó indistinguible de aquel del MD sin fraccionar. Esencialmente, se observó escasas bandas polipeptídicas en la fracción MD-B. Este patrón de proteínas no se modificó,

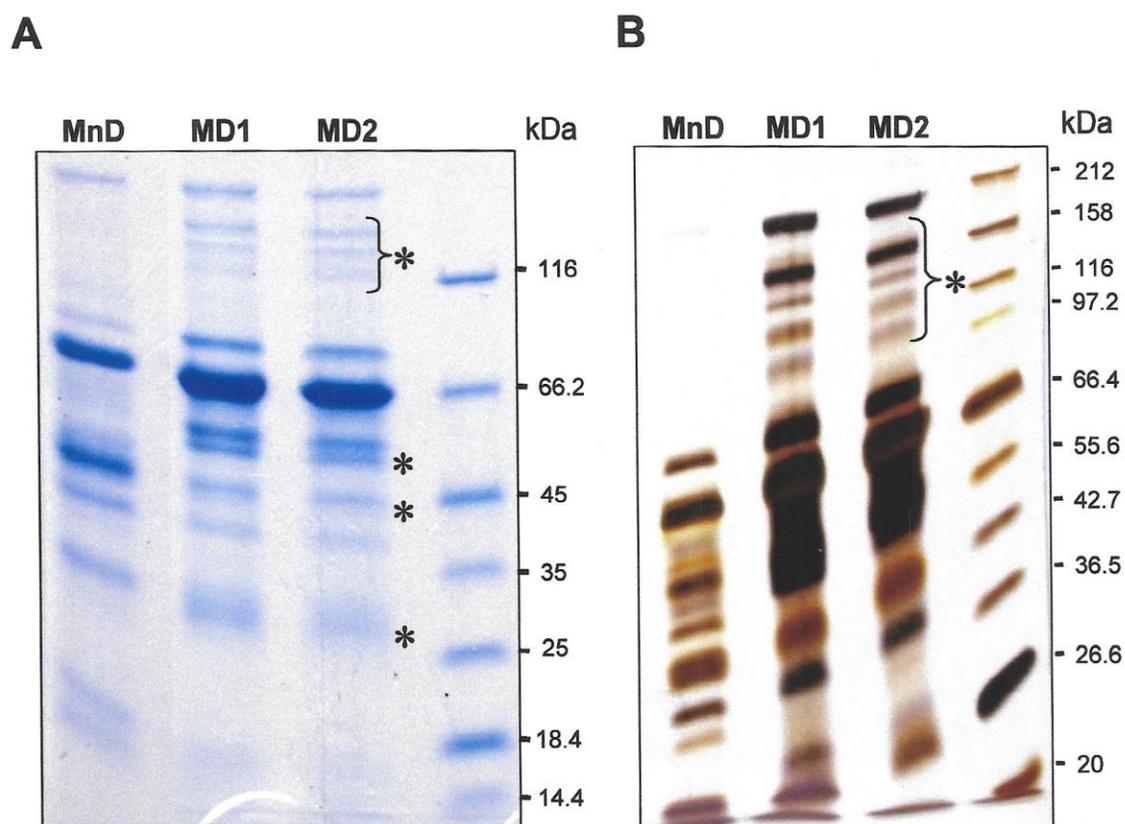
aún después del lavado exhaustivo de la fracción retenida (MD-A). Estos resultados sugieren que, en condiciones nativas, la mayoría de las proteínas de tamaño inferior a 50 KDa se encuentran asociadas con otras proteínas en el MD y/o su concentración se encuentra bajo el límite de detección del método de análisis.

#### 2.4.2 *Efecto de los componentes de las subfracciones del MD sobre la proliferación y la diferenciación miogénica de las CTMr*

Para realizar esto, las CTMr fueron incubadas en medio con 0,5% de SFB suplementando con 0,5 mg/ml de proteína de las fracciones MD-A y MD-B. En el curso de los 7 días de ensayo se analizó la morfología, la viabilidad celular y la diferenciación miogénica.

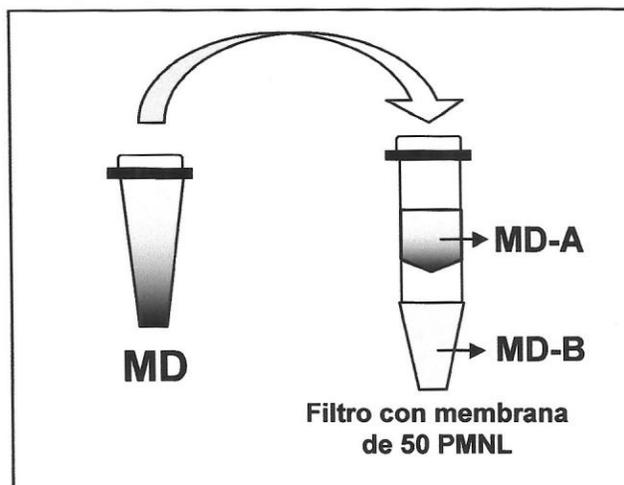
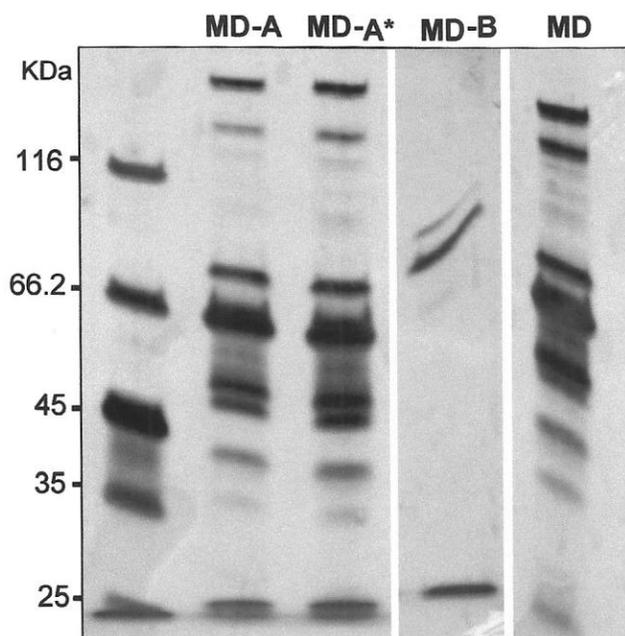
La Figura 20A muestra que el factor responsable del efecto proliferativo está contenido en la fracción MD-A. El análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de marcadores miogénicos indicó que esta misma fracción también generó un aumento del 30%-40% en el número de células MyoD positivas (Fig. 20B). Las células expuestas a la fracción MD-B respondieron de manera análoga a las CTMr incubadas en condición control (solo 0,5% de SFB).

Los datos sugieren, por lo tanto, que los componentes del MD que estimulan la proliferación y la diferenciación miogénica de CTMr estarían contenidos en la fracción de proteínas que en su estado nativo, como monómeros o asociadas a otras proteínas, tienen un tamaño molecular similar o superior a 50 KDa.



**FIGURA Nº 18. PATRON ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS COMPONENTES DEL MD Y DEL MnD**

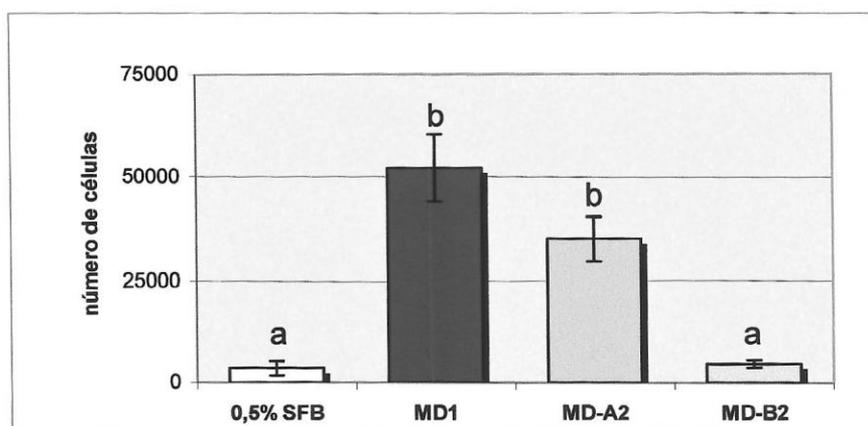
El MD y el MnD fueron sometidos a electroforesis desnaturalante unidimensional en geles en gradiente de concentración de poliacrilamida entre 5-15% y las proteínas fueron visualizadas mediante tinción con azul de coomasie (A) o con nitrato de plata (B). Se analizó igual cantidad de proteínas (8  $\mu$ g para A y 2  $\mu$ g para B) de dos muestras de MD (MD1 y MD2) y una de MnD. Los asteriscos indican algunas diferencias cuantitativas y cualitativas en el patrón de proteínas entre el MD y MnD de geles representativos de varias electroforesis. Al costado derecho de los electroforetogramas se muestra la migración de los marcadores de tamaño molecular.

**A****B**

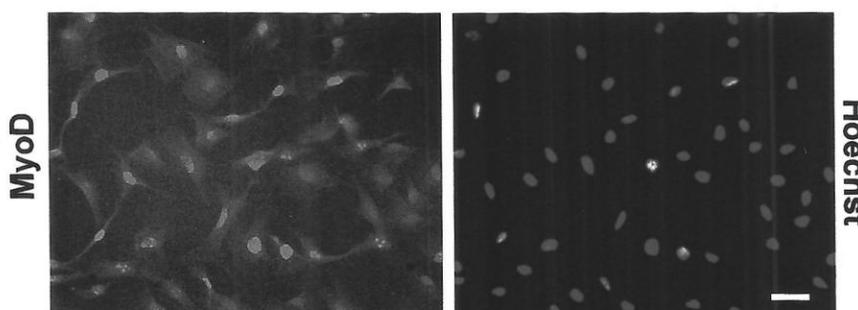
**FIGURA N° 19. ANÁLISIS DE LAS PROTEINAS OBTENIDAS DEL FRACCIONAMIENTO DEL MD MEDIANTE TAMICES MOLECULARES**

(A) Esquema de obtención de las fracciones de MD, fracción retenida (MD-A) y fracción filtrada (MD-B) en membrana de 50 kDa de peso molecular nominal límite (50 PMNL). (B) Las fracciones derivadas del MD (MD-A y MD-B) y el MD fueron analizados mediante electroforesis desnaturalante en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración entre 5-15% en una dimensión y teñidas con nitrato de plata. Se analizó igual cantidad de proteínas de MD y de las fracciones MD-A y MD-B. MD-A\* denota la fracción de MD-A lavada exhaustivamente (con 20 volúmenes).

A



B



**FIGURA Nº 20. EFECTO DE COMPONENTES DE LAS FRACCIONES DE MD SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS CTMr**

Las células fueron sembradas a una densidad de 1500 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo con 0,5% de SFB solo (control) o suplementado con 0,5 mg/ml de MD1 o con 0,5 mg/ml de las fracciones obtenidas de MD2 (MD-A2 y MD-B2). (A) A los 7 días, las células viables fueron contadas. Los datos representan el número promedio de células  $\pm$  la desviación estándar de 2 experimentos realizados en triplicado. Letras distintas denotan diferencias significativas,  $p < 0,05$ . (B) A los 2 días de cultivo con MD-A2, la expresión de MyoD fue determinada por análisis de inmunofluorescencia (panel izquierdo). La tinción con Hoechst (panel derecho) confirma la localización nuclear de la señal inmuofluorescente. La escala de la barra representa 50  $\mu$ m.

### 3. ANÁLISIS DE PROTEINAS CANDIDATO VINCULADAS AL DAÑO Y/O REGENERACIÓN MUSCULAR QUE SERIAN RESPONSABLES DEL EFECTO DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICO PRODUCIDO POR MD EN LAS CTMr

Los resultados presentados han mostrado que las actividades estimuladoras de la proliferación y diferenciación de progenitores miogénicos (CTMr y de las C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) están contenidas en la fracción del MD con tamaño molecular igual o superior a 50 kDa. Por otra parte, la literatura reporta estudios *in vitro* que han implicado a una serie de factores tróficos en la mantención del balance entre proliferación y diferenciación de las células satélite para el restablecimiento de la arquitectura y la función muscular durante el proceso de regeneración. Entre estos se incluye a miembros de la familia de FGF, de la familia de TGF- $\beta$ , IGF, HGF, TNF- $\alpha$ , citoquinas de la familia IL-6 y otros. Con estos antecedentes, se abordó la búsqueda de aquellos factores tróficos y de citoquinas pro-inflamatorias que puedan ser causantes de la diferenciación miogénica producida por MD ya señalada en esta tesis.

#### 3.1 Determinación de la presencia de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IGF-1 en el MD

Las citoquinas IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  fueron detectadas por ensayos de ELISA, mientras que IGF-1 fue analizada mediante RIA. La Figura 21 muestra que en el MD se detectó la presencia de IL-6 e IL-1 $\beta$ , mientras que TNF- $\alpha$  no fue detectado. Además ninguna de estas citoquinas fue encontrada en el medio control MnD. La concentración promedio cuantificada de las interleuquinas IL-6 e IL-1 $\beta$  en el MD fue de 384,5 y 306,3

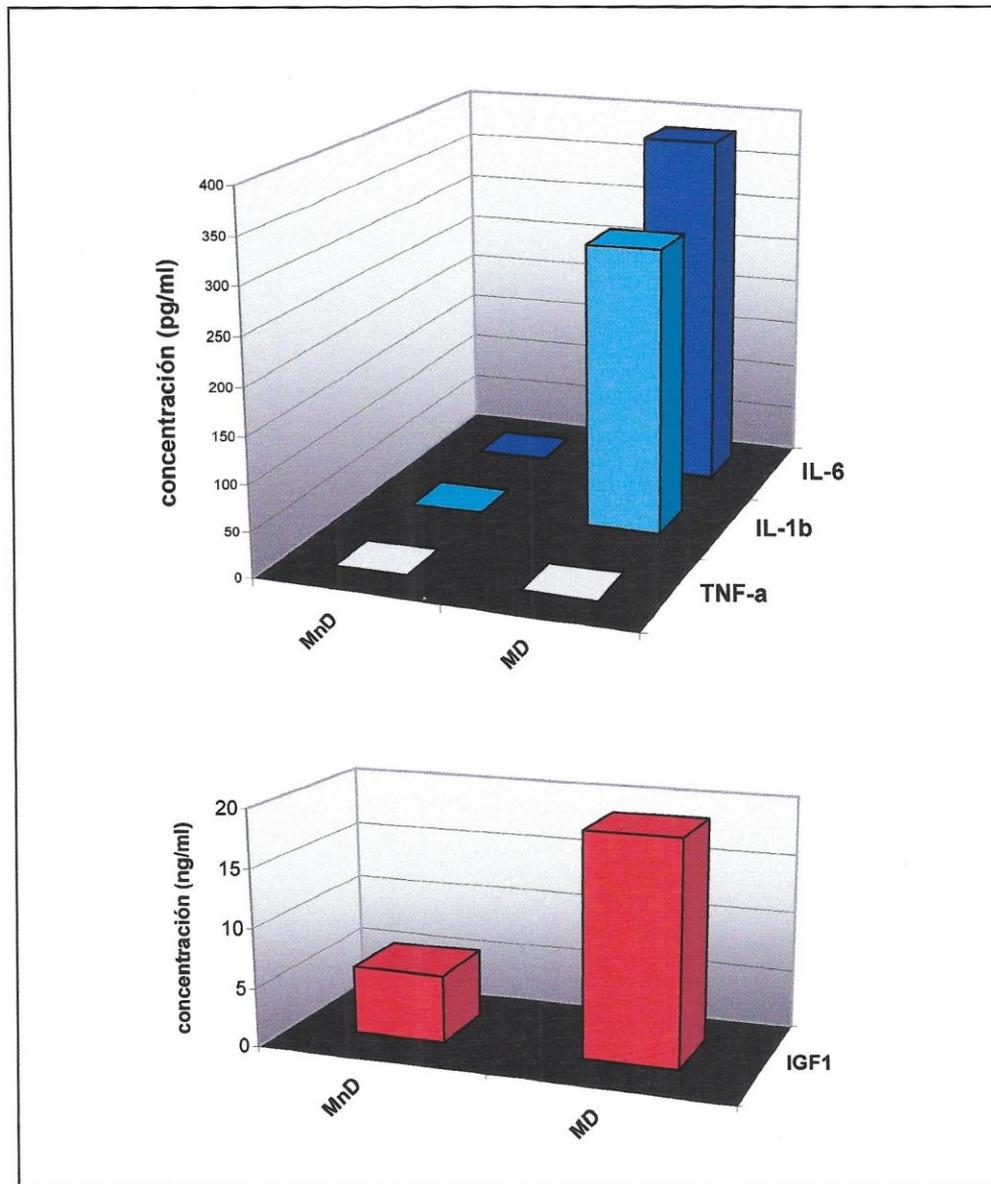


FIGURA Nº 21. DETECCIÓN DE LAS CITOQUINAS IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  E IGF-I EN MD.

Las citoquinas IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  fueron determinadas mediante ELISA, mientras que IGF-1 fue pesquisado mediante RIA. Los datos representan el promedio de la concentración en dos muestras de MD y de MnD, determinadas en duplicado. La desviación estándar de los resultados para IL-6 e IL-1 $\beta$  en el MD es  $\pm 200$  y  $66,5$  pg/ml, respectivamente. Mientras que la desviación estándar para los resultados de IGF-1 en el MD y MnD es  $6,7$  y  $0,4$  ng/ml, respectivamente.

pg/ml, respectivamente. En tanto, IGF-1 fue detectada en ambos medios condicionados, MD y MnD; sin embargo, su concentración fue aproximadamente 3 veces mayor en el MD respecto del MnD.

### 3.2 Efecto de IL-6 e IGF-1 contenidos en el MD sobre la diferenciación miogénica de progenitores musculares

Dado que no se detectó TNF- $\alpha$  en el MD y que los antecedentes de la literatura muestran que IL-1 $\beta$  no estimula la diferenciación miogénica (Broussard y col., 2004), se continuó únicamente con el estudio del efecto de IL-6 e IGF-1. Una primera aproximación consistió en neutralizar la actividad de estas proteínas en el MD mediante anticuerpos específicos e investigar su efecto sobre la diferenciación miogénica. Para esto, los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, que como se demostró anteriormente responden de manera contundente a los factores miogénicos contenidos en el MD (Fig. 15 y 16), fueron cultivados con MD (0,5 mg/ml) en presencia de anti-IL6 o anti-IGF1 (0,4  $\mu$ g/ml y 7,4  $\mu$ g/ml respectivamente), durante 7 días. Estas concentraciones de anticuerpo neutralizante para IL-6 e IGF-1 fueron 100 y 50 veces mayores que las sugeridas por el proveedor.

La Figura 22 muestra que en presencia del anticuerpo bloqueador de la actividad de IL-6, MD mantuvo su efecto sobre la diferenciación miogénica de los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Los mioblastos se diferenciaron a miotubos, como manifiesta la expresión de miogenina y de miosina (MHC) evaluada a los 6 días de cultivo. El anticuerpo bloqueador por sí solo (en ausencia de MD) no tuvo un efecto diferente del medio de cultivo control (con 0,5% de SFB). En contraposición, al neutralizar la actividad de

IGF-1, la diferenciación miogénica disminuyó notoriamente. Al cabo de 6 días de cultivo con MD con el anticuerpo anti-IGF1 se observó un número muy reducido de miotubos. Además, estos eran pequeños y cortos. El análisis mediante inmunofluorescencia (Figura 22) constató una muy baja expresión de miogenina y de miosina (MHC), en claro contraste con lo observado al cultivar los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> con MD. La expresión de los marcadores miogénicos en las células cultivadas sólo con anti-IGF1 fue comparable a la observada en la condición control. **Estos resultados sugieren que IGF-1 participa en la diferenciación miogénica inducida por el MD y que IL-6 pareciera no ser responsable del efecto miogénico observado.**

### 3.2.1 *Participación de IL-6 e IGF-1 en el efecto proliferativo asociado a MD*

Adicionalmente, se investigó la posibilidad que esas proteínas participen en el efecto estimulador de la proliferación ejercido por MD. Para ello se usó la misma estrategia experimental de neutralización de la actividad de estas proteínas mediante anticuerpos. La Figura 23 muestra que al bloquear la actividad de IL-6 los mioblastos proliferaron en una magnitud similar a los mioblastos cultivados con el MD. Mientras que al bloquear la actividad de IGF-1 en el MD, el efecto proliferativo se vio disminuido en un 10% si se compara con la proliferación de los mioblastos cultivados con MD. El número de células cuantificadas al incubar sólo con el anticuerpo bloqueador de IL-6 o IGF-1 no fue distinto al de los mioblastos control. De manera semejante a la descrita para las C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, cuando se analizó el efecto del bloqueo de la actividad de IL-6 usando las CTMr, se constató que éstas siguieron proliferando de manera similar a las cultivadas con el MD. Asimismo, el bloqueo de la actividad de IGF-1 no afectó la

proliferación de las CTMr a diferencia del 10% de disminución observado con las células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Igualmente, el número de células cuantificadas al incubar solo con el anticuerpo bloqueador de IL-6 o IGF-1 no fue distinto de las CTMr control.

Esto sugiere que IGF-1 sólo contribuye en baja magnitud al efecto proliferativo ejercido por el MD sobre las C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y pareciera que IL-6 no sería tampoco responsable del efecto proliferativo asociado a MD. En conjunto con los resultados anteriores, estos apuntan a que los factores en el MD que causan proliferación serían distintos de los que ejercen diferenciación miogénica.

### 3.3 Efecto de IGF-1 exógeno sobre la diferenciación miogénica de las CTMr

Las evidencias que se han presentado sugieren que IGF-1 es uno de los factores presentes en el MD que participa del efecto en la diferenciación miogénica de progenitores musculares. Para confirmar estos resultados se estudió el efecto de IGF-1 exógeno sobre la diferenciación miogénica de las CTMr.

Las CTMr fueron incubadas durante 7 días con distintas cantidades de IGF-1. La Figura 24 muestra que IGF-1 (0,1- 10 ng/ml) no tuvo un efecto relevante sobre la proliferación de las CTMr. Sin embargo, IGF-1 incrementó la expresión de miosina (MHC) en aproximadamente el 3% del total de células tratadas por 7 días con IGF-1 (10 ng/ml), según estudios de citometría de flujo (Figura 25). En las células tratadas con medio control (0,5% de SFB) no se detectó expresión de este marcador miogénico (Fig. 25). No obstante, aún en ensayos prolongados por 14 días, no fue posible observar células alargadas y multinucleadas como las que se describió al tratar las CTMr con

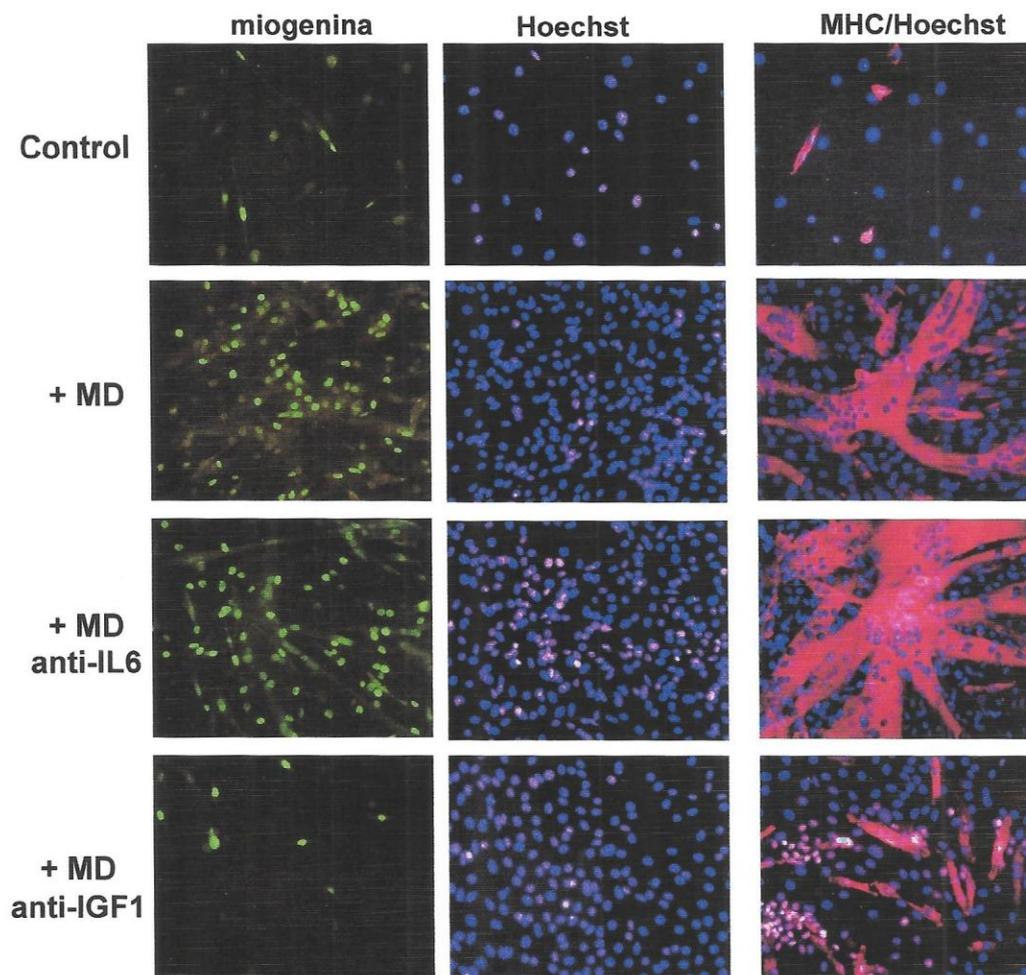
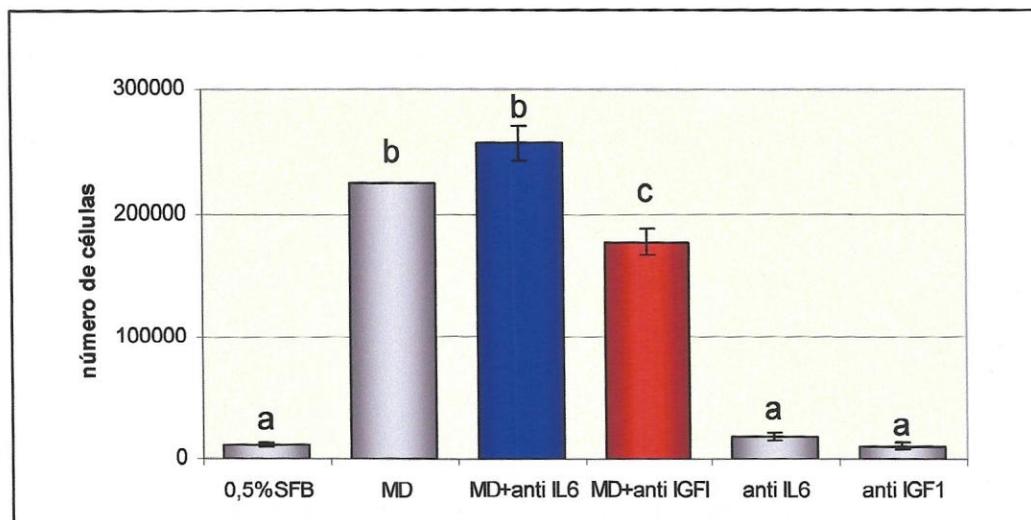
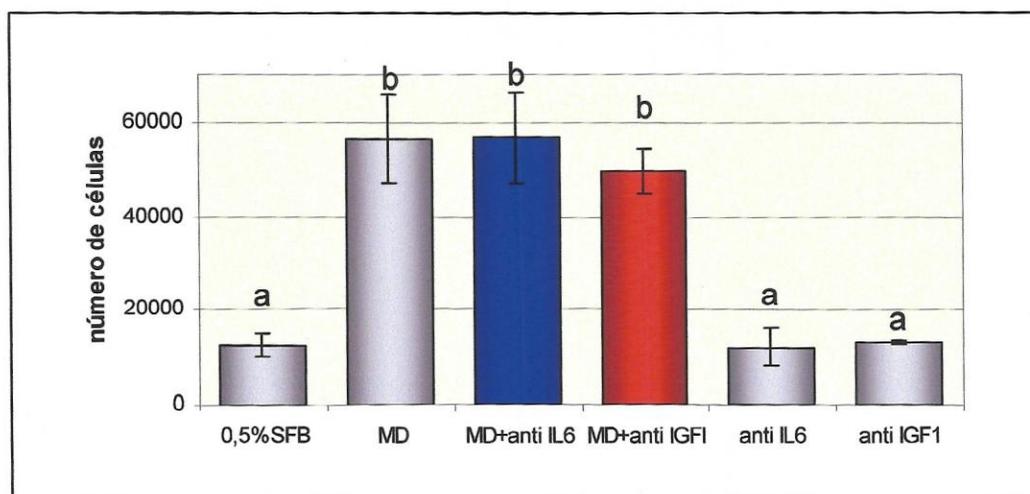


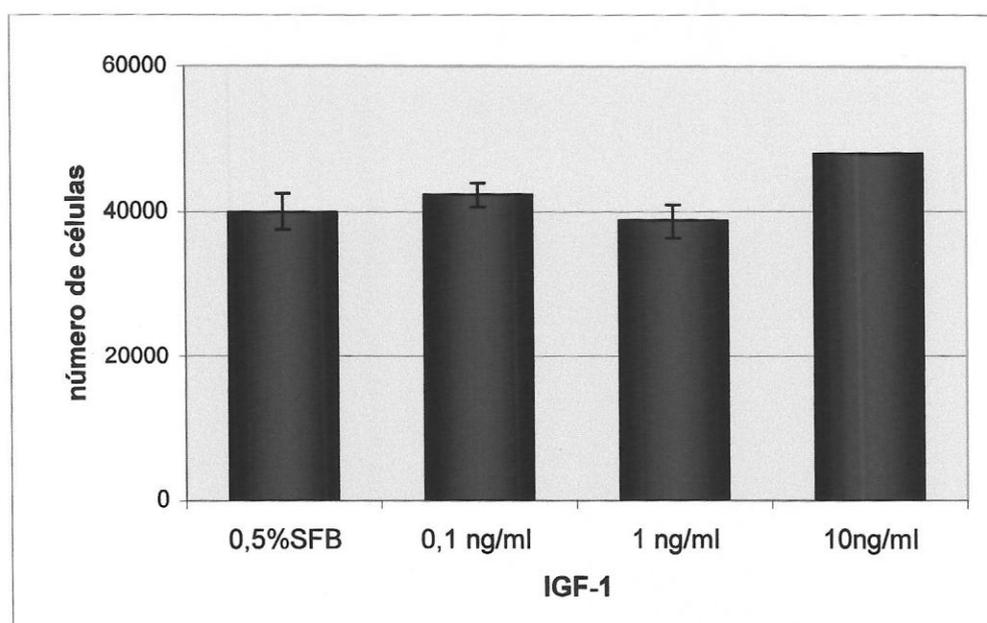
FIGURA Nº 22. EFECTO DE LA NEUTRALIZACION DE IL-6 E IGF-1 EN EL MD SOBRE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE PROGENITORES MUSCULARES.

Los mioblastos  $C_2C_{12}$  fueron sembrados a una densidad de 1500 células/cm<sup>2</sup> e incubados con medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB solo (Control) o suplementado con 0,5 mg/ml de MD o con MD y el anticuerpo bloqueador de IL-6 o de IGF-1 (0,4 µg/ml y 7,4 µg/ml, respectivamente). A los 6 días de cultivo, la expresión de miogenina y de miosina (MHC) fue determinada por análisis de inmunofluorescencia. La localización nuclear de la inmunofluorescencia fue confirmada mediante tinción con Hoechst. Los resultados representan un experimento de bloqueo de la actividad de IL-6 e IGF-1, realizado en duplicado. La escala de la barra representa 50 µm.

**A****B**

**FIGURA Nº 23. CONTRIBUCIÓN DE IL-6 E IGF-1 AL EFECTO PROLIFERATIVO DEL MD.**

Los mioblastos  $C_2C_{12}$  (**A**) y las CTMr (**B**) fueron sembrados a una densidad de 1500 células/cm<sup>2</sup> y 2500 células/cm<sup>2</sup>, respectivamente e incubados con medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB solo o suplementado con 0,5 mg/ml de MD o de MD y el anticuerpo bloqueador de IL-6 e IGF-1 (0,4 µg/ml y 7,4 µg/ml, respectivamente) o solo con la misma concentración del anticuerpo bloqueador de IL-6 e IGF-1. A los 7 días de cultivo, las células viables fueron contadas. Los datos representan el número promedio de células ± la desviación estándar de 2 experimentos realizados en triplicado. Letras distintas denotan diferencias significativas,  $p < 0,02$

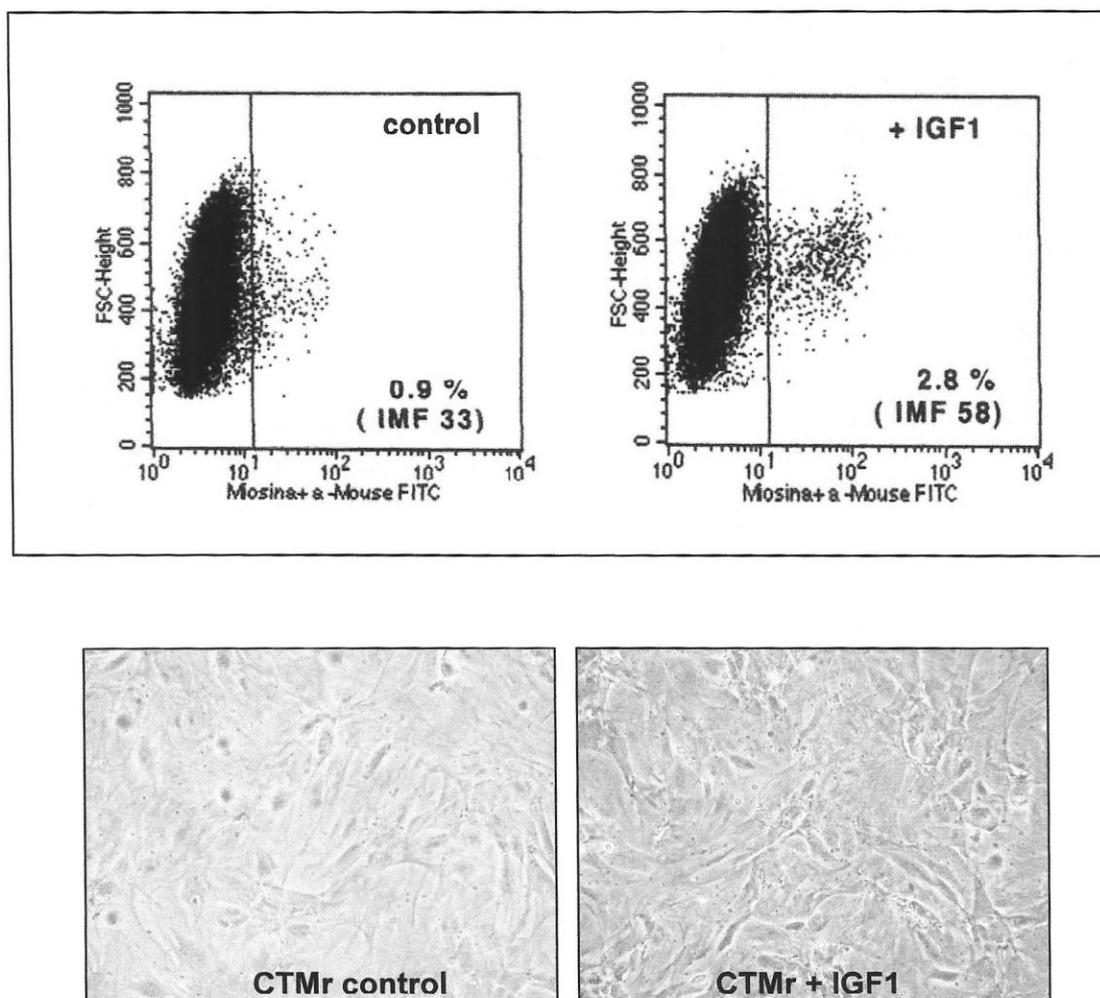


**FIGURA Nº 24. EFECTO DE IGF-1 EXÓGENO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CTMr**

Las células fueron sembradas a una densidad de 10000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,5% de SFB solo o suplementado con IGF-1 recombinante, en la concentración indicada. A los 7 días de cultivo, las células viables fueron contadas. Los datos representan el promedio en el número de células  $\pm$  la desviación estándar de 2 experimentos realizados por triplicado. No hay diferencias significativas en el número de células de CTM cultivadas con IGF-1  $\leq$  10 ng/ml,  $p > 0,05$ .

MD. La Figura 25 muestra que la morfología de las CTMr cultivadas con IGF-1 no fue diferente de las células tratadas bajo condición control.

Estos resultados nos llevan a pensar que si bien IGF-1 tendría un papel en la diferenciación miogénica de las CTMr, no sería suficiente para llevar a las células hacia la diferenciación terminal, con la expresión del fenotipo característico de una célula muscular esquelética.



**FIGURA Nº 25. EFECTO DE IGF-1 EXÓGENO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS CTMr**

Las células fueron sembradas a una densidad de 8000 células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio de cultivo con 0,5% de SFB solo (control, sin IGF1) o suplementadas con 10 ng/ml de IGF-1 recombinante. A los 7 días de cultivo, se analizó la expresión del marcador miogénico miosina (MHC) mediante citometría de flujo (panel superior). Valores corresponden al porcentaje del total de células marcadas para miosina. IMF: intensidad media de fluorescencia. La morfología de las células fue evaluada durante el transcurso del experimento. Las fotografías fueron tomadas desde un microscopio de contraste de fase y son representativas de los cultivos a los 7 días (panel inferior).

## DISCUSIÓN

El músculo esquelético adulto es un tejido estable que, en circunstancias normales, tiene muy poco recambio celular. Sin embargo, ante una situación de daño, el músculo esquelético tiene una extraordinaria capacidad de regeneración. La regeneración del tejido muscular es un proceso altamente coordinado que involucra la inducción de varios procesos celulares mediante los cuales las células progenitoras musculares se activaban, proliferan, diferencian y finalmente, se fusionan para la formación de una nueva miofibra con capacidad contráctil. La activación de las células progenitoras residentes en el músculo, denominadas células satélite, es clave en el proceso de regeneración y se asemeja a la miogénesis embrionaria en varios aspectos, como por ejemplo, en la inducción *de novo* de la expresión de factores de transcripción específicos.

Las evidencias, que datan del destacado trabajo de Ferrari y cols. de 1998 hasta recientes estudios (Corti y col., 2002; LaBarge y Blau, 2002; DeBari y col., 2003; Abedi y col., 2004; Lee y col., 2005; Palermo y col., 2005), sostienen que, aparte de las células satélite, las células troncales adultas residentes en otros tejidos también contribuyen al proceso de regeneración muscular. En particular, estos estudios demuestran que las células troncales derivadas de la médula ósea (MO) no sólo contribuyen a la formación de nuevas miofibras, sino también, al repoblamiento del “*pool*” de células satélite (LaBarge y Blau, 2002; Dreyfus y col., 2004). Los datos

MO participarían en la formación de fibras musculares esqueléticas (Ferrari y col., 1998; Camargo y col., 2003; Corbel y col., 2003; Shi y col., 2004; Lee y col., 2005). Cual de estas células troncales provee significativamente de progenitores musculares, es aún objeto de debate. No obstante, la mayoría de estos estudios coincide en que el porcentaje de integración de células de la MO a la fibra muscular aumenta cuando el tejido muscular ha sido dañado o se ha sometido a un estrés físico (LaBarge y Blau, 2002; Abedi y col., 2004; Palermo y col., 2005). Así, los resultados de estos estudios *in vivo* apuntan a que las señales generadas en respuesta al daño muscular no sólo gatillan el programa de diferenciación miogénico en las células satélite sino también de las células troncales provenientes de la MO.

En este contexto, se planteó este trabajo de tesis, destinado a investigar *in vitro* la capacidad de los factores solubles producidos o liberados por el músculo esquelético dañado para inducir la diferenciación miogénica de células troncales mesenquimáticas derivadas de la MO

Para abordar los objetivos de este trabajo de tesis se utilizó el modelo de células troncales provenientes de la médula ósea de rata, esto porque las CTM son células multipotentes, fáciles de aislar y expandir en cultivo. De acuerdo a lo anticipado, las células adherentes obtenidas de la MO de rata, bajo estímulos no fisiológicos conocidos dieron origen a células de los linajes osteogénico, adipogénico y miogénico (Figura 2), propiedad funcional característica de las CTM. Cabe señalar que el potencial de diferenciación adipogénico que exhibieron las CTMr se mantuvo sólo hasta el cultivo de pasaje número seis; mientras que el potencial de diferenciación osteogénico se perdió incluso en cultivos con menor número de pasajes. Observaciones similares respecto del

potencial de diferenciación osteogénico de las CTMr ya habían sido reportadas por otros autores (Brugge y Jansen, 2002; Sugiura y col., 2004), sugiriendo la pérdida de progenitores osteogénicos después de extensivos pasajes de las células. Esto último podría explicar la pérdida de la respuesta de diferenciación adipogénica observada para las CTMr. Sin embargo, es posible que los estímulos usados para inducir la diferenciación adipogénica u osteogénica no sean completamente adecuados para las CTM de rata, pudiendo requerirse otros factores como lo han sugerido algunos autores (Nuebauer y cols., 2004). Por lo anterior, para los estudios del potencial de diferenciación miogénico se utilizó siempre las CTMr de los pasajes 2 y 3. Al igual que lo reportado por Wakitani y cols., 1995, la exposición de las CTMr al inductor no fisiológico, hipometilante del DNA 5-azacitidina resultó en la formación de discretos focos de células alargadas y multinucleadas con capacidad de contraerse espontáneamente, lo que constituye el fenotipo característico de células miogénicas (Figura 2C).

Al estudiar la respuesta de las CTMr a 5-azacitidina, mediante el análisis de la expresión de los marcadores moleculares de diferenciación miogénica, inesperadamente se detectó que, en la condición control de cultivo (con 10% de SFB), había expresión de Myf-5, MyoD y desmina, en un 80%, 2,5% y 5% de las células, respectivamente (Figuras 4, 8, 9 y 11). Observaciones similares, esto es, células que expresan MyoD en ausencia de estímulo miogénico, también fueron registradas por Suva y col., 2004 en una pequeña fracción de células adherentes-no hematopoyética de MO humana y por Corti y col., 2002, en MO completa de ratón recién aislada (antes de cultivar). Nuestros datos además de los anteriores, sugieren la presencia de progenitores comprometidos con el

linaje miogénico en las células troncales mesenquimáticas de la MO. La expresión de marcadores tempranos correspondientes a otros linajes como el osteogénico, adipogénico e incluso neural, también ha sido observado en cultivos de CTM humanas y de rata realizados en el laboratorio. Otros autores también han reportado hallazgos similares en cultivos con pocos pasajes de CTM y en células frescas de la MO (Deng y cols., 2001; Ratajczak y cols., 2004). Y aunque no es posible descartar que el solo hecho de sacar a las CTM de su nicho habitual pudiera afectar su programa génico, en conjunto, estas características implican que a pesar que los cultivos de CTM son morfológicamente homogéneos, estas células en cultivo serían heterogéneas en cuanto a que existirían subpoblaciones de células con distinto grado de multipotencia o de compromiso de diferenciación hacia los diferentes linajes mesenquimáticos y no mesenquimáticos. Si esto también ocurre *in vivo* es algo no resuelto. Ante esto es posible especular que el progreso de algún programa de diferenciación de estos progenitores está inhibido en su nicho natural, es decir, en el ambiente de la MO y que sólo cuando las células progenitoras se encuentran con un micro ambiente adecuado en los tejidos correspondientes, se produciría la diferenciación terminal hacia los linajes respectivos, contribuyendo al crecimiento o regeneración del tejido.

## 1. FACTORES SOLUBLES DERIVADOS DEL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DAÑADO INDUCEN LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA DE LAS CTMr

Se ha propuesto que un micro-ambiente favorable para iniciar el proceso de regeneración, está compuesto en parte por los factores difundidos en el tejido muscular dañado (Bischoff, 1986; Li y col., 2000; Chargé y Rudnicki, 2004). En esta tesis se investigó si estos factores pueden también promover la diferenciación miogénica *in vitro* de CTMr, para lo cual se cultivaron estas células con medio condicionado por músculo esquelético dañado previamente *in vivo*.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis demostraron que el medio condicionado por músculo dañado contiene algún o algunos factores que inducen la diferenciación miogénica de las CTMr (Santa María y col., 2004), sobre la base de las siguientes evidencias:

1) El medio condicionado por músculo dañado con  $BaCl_2$  (MD) generó en las CTMr, un aumento transitorio en el número de células que expresan MyoD (Figura 9, Tabla I). De acuerdo con los antecedentes, el factor de transcripción MyoD juega un papel esencial en la regulación de la regeneración muscular esquelética, participando directamente en el control de la salida de ciclo celular de las células satélite e iniciando la cascada de expresión génica que es responsable del curso del proceso de diferenciación miogénica (Megency y col, 1996; Kitzmann y Fernández, 2001; Parker y col., 2003). Así, este aumento transitorio en las células que expresan MyoD podría indicar el inicio del proceso de diferenciación miogénica de las CTMr.

- 2) En el transcurso de la incubación de las CTMr con MD, se produjeron cambios en la morfología de las células, observándose desde los 6-7 días, células alargadas y multinucleadas que mostraban ondas de contracción espontánea (Figura 7). Este tipo de células se asemejaba a aquellas detectadas después de exponer las CTMr al inductor miogénico 5-azacitidina (Figura 2D; Wakitani y col., 1995).
- 3) Concomitante con los cambios morfológicos descritos, las células alargadas y multinucleadas expresaron las proteínas marcadoras de las etapas intermedias y tardías de la diferenciación miogénica: miogenina,  $\alpha$ -actinina y la miosina (MHC) (Figura 10 y 11). El análisis cuantitativo indicó que entre el 2 y el 3% del total de células expuestas a MD presentaba características inmunofenotípicas y funcionales del tipo miogénico (Figura 11). Cada vez se tienen más datos que indican que una apropiada densidad celular, distribución espacial celular y la presencia de componentes extracelulares sólidos, además de factores solubles en el cultivo parecen ser críticos para la eficiente determinación del destino de las CTM (Gregory y col., 2005), por tanto el porcentaje de conversión miogénico no es menor, considerando que las CTM se expusieron a sólo una parte de este micro ambiente generado en el tejido muscular dañado (factores solubles). Asimismo no se puede descartar que *in vivo* o en condiciones semejantes en cuanto a matriz extracelular y contactos celulares producidos en el ambiente de daño muscular, el porcentaje de conversión miogénica de las CTM sea mayor.
- 4) El medio condicionado por músculo contuso (MD-contuso) también ejerció un efecto similar a aquel provocado por el MD derivado de músculo dañado con BaCl<sub>2</sub>.

Esto es, provocó un aumento transitorio del número de células que expresaban MyoD e indujo en la expresión de marcadores de diferenciación miogénica intermedia y tardía en una subpoblación de las CTMr (Figura 13). Lo anterior indica que, independientemente de la naturaleza del daño muscular realizado (químico o mecánico), el medio condicionado por músculo dañado contiene señales difusibles que estimulan la diferenciación miogénica de las CTMr.

5) Finalmente, los cambios morfológicos e inmunofenotípicos antes descritos no fueron reproducidos al incubar las CTMr con medio condicionado por músculo no dañado (MnD) (Figura 7) y tampoco por medio condicionado por músculo inyectado con PBS (no mostrado). Esto implica que las señales que gatillan la diferenciación miogénica de las CTMr no están presentes en el músculo sin daño o bien, su concentración se encuentra por debajo del umbral de respuesta de las células.

La capacidad del MD para inducir diferenciación miogénica también fue ensayada sobre la línea celular murina  $C_2C_{12}$ , considerada un modelo de mioblastos y también, sobre CTM de origen humano. Las células  $C_2C_{12}$  respondieron de manera aún más temprana y contundente que las CTMr a los factores de diferenciación miogénicos presentes en el MD (Figura 15 y 16), llegando incluso a expresar los marcadores tardíos de diferenciación miogénica en más de un 60% de las células  $C_2C_{12}$ . Este resultado valida aún más la efectiva presencia de factores miogénicos en el MD. En tanto, en las mismas condiciones, las CTM humanas no mostraron células con característica morfológicas e inmunofenotípicas de células del tipo miogénico. Dado que el potencial de diferenciación hacia linaje miogénico de estas células no fue comprobado mediante 5-azacitidina, no es posible descartar que la falta de respuesta al MD se originara en la

pérdida de los progenitores miogénicos en el cultivo expandido de las CTM humanas usadas para estos ensayos. Lo anterior no es sorprendente, ya que se ha observado que el potencial de diferenciación adipogénico de las CTM humanas se va perdiendo conforme incrementa el número de pasajes del cultivo (Conget y Minguell, 1999).

Adicionalmente a la inducción en la diferenciación miogénica de las CTMr, el medio condicionado por músculo dañado tuvo un efecto estimulador de la proliferación. Esto último sin duda, también influyó en el porcentaje calculado de la conversión de CTMr a células miogénicas. El efecto estimulador de la proliferación celular fue verificado tanto sobre las CTMr (Figura 6), como sobre otras líneas celulares y cultivos primarios de diferente origen tisular (Figura 14 y 15), indicando que los factores presentes en el MD ejercen un efecto proliferativo inespecífico.

## 2. LOS FACTORES CON ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y MIOGÉNICA SEGREGAN EN LA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TAMAÑO MOLECULAR SUPERIOR A 50 kDa

La caracterización inicial indicó que tanto la actividad estimuladora de la proliferación como aquella inductora de la miogénesis contenidas en el MD eran sensibles a la desnaturalación térmica (Figura 17), sugiriendo la naturaleza proteica de los factores responsables de ambas actividades. El análisis con digestión con proteasas hubiera sido una alternativa para apoyar esta observación.

Un análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas contenidas en el MD mostró un perfil polipeptídico poco complejo, contabilizándose alrededor de 15 bandas al teñir los geles con azul de Coomassie o con nitrato de plata. Se pudo constatar diferencias en

el patrón polipeptídico del MD en relación al MnD (Figura 18). En general, se intensificaron la mayoría de las bandas presentes en el MnD y aparecen bandas nuevas de más de 90 kDa y otras de menos de 50 kDa. La cabal identificación de los polipéptidos que exhiben un patrón diferencial de expresión podría ser abordada mediante las metodologías de la proteómica (Gajendran y col., 2002).

En pos de la caracterización del o los factores presentes en el MD que serían responsables del efecto sobre la diferenciación hacia linaje miogénico de las CTMr, se recurrió a los tamices moleculares. Así, el MD fue filtrado a través de membranas que retienen proteínas de tamaño molecular nominal superior a 50 kDa (Figura 19A). Al analizar las proteínas en las fracciones resultantes, se observó que el patrón electroforético de la fracción retenida (con tamaño  $\geq$  50 kDa) era indistinguible de aquel del MD sin fraccionar; mientras que la fracción filtrada mostraba escasas bandas polipeptídicas (Figura 19B). La escasez de bandas en la fracción de las proteínas de tamaño inferior a 50 kDa podría atribuirse a que su concentración se encuentra bajo el límite de detección del método de análisis. Por otra parte, teniendo en cuenta que muchas proteínas secretadas (como las citoquinas) suelen encontrarse asociadas a sus respectivos receptores solubles (Levine, 2004), es posible pensar que estas proteínas pequeñas podrían estar asociadas con otras proteínas en el medio condicionado y por tanto, en su mayoría, serían recuperadas en la fracción con tamaño  $\geq$  50 kDa y posteriormente, éstas serían disociadas en las condiciones desnaturalantes de la electroforesis. Los ensayos de la actividad estimuladora de la proliferación y de la diferenciación miogénica realizados con las fracciones derivadas del MD mostraron que ambas actividades permanecieron en la fracción correspondiente a las proteínas de

tamaño  $\geq$  a 50 kDa (Figura 20). Esto indica que, en su estado nativo, estos factores (ya sea como monómeros o como multímeros) tendrían un tamaño molecular similar o superior a 50 KDa.

### 3. EL MEDIO CONDICIONADO POR MÚSCULO DAÑADO CONTIENE PROTEÍNAS VINCULADAS A LA RESPUESTA AL DAÑO Y REGENERACIÓN MUSCULAR

En general, el proceso de regeneración muscular en mamíferos es caracterizado por una fase degenerativa seguida por una fase regenerativa (Chargé y Rudnicki, 2004). El evento inicial en la regeneración muscular es la necrosis de la fibra muscular, que resulta en un aumento de la permeabilidad de la miofibra y por lo tanto, en la liberación de proteínas musculares. La fase temprana de respuesta al daño muscular es usualmente acompañada por la activación de células de respuesta inflamatoria residentes en el músculo y de las células miogénicas. Las primeras liberarían señales quimiotácticas para células inflamatorias circulantes. Posteriormente, se inician los procesos de reparación de las fibras musculares, que comienzan con la activación y posterior proliferación de células miogénicas. Aunque las fases degenerativa y regenerativa del proceso de reparación muscular resultan similares independientemente de la naturaleza del agente causante del daño, la cinética y amplitud de cada fase puede variar según la extensión del daño, del tipo de músculo afectado o del animal experimental (Mitchell y col., 1992; Lefaucheur y Sebillé, 1995). Las fases de necrosis celular y regeneración muscular en respuesta al daño muscular causado por la inyección de una solución de BaCl<sub>2</sub> en músculo de ratas (el modelo de

daño utilizado en este trabajo de tesis) fueron caracterizadas por Caldwell y col., 1990. Estos autores mostraron que un día después de inyectar  $BaCl_2$  en el cuádriceps de ratas era observable un área de necrosis en torno del punto de inyección. Al cabo los dos y 3 tres días, numerosos macrófagos y mioblastos invadían al área necrótica y a los 5 días ya se observaron miotubos parcial y completamente regenerados. De acuerdo con estos antecedentes, es posible pensar que el medio condicionado, preparado a partir del músculo *Tibialis* aislado dos días después de inyectar la solución de  $BaCl_2$ , contenga los factores aportados tanto por los macrófagos infiltrados como por las células miogénicas activadas en la zona necrótica.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* han implicado a una serie de factores de crecimiento como reguladores positivos o negativos de los eventos moleculares que subyacen a la regeneración muscular (Chargé y Rudnicki, 2004). De los reguladores positivos de la regeneración muscular, estudios *in vitro* mencionan que los IGFs y las citoquinas de la familia de las interleuquinas-6, LIF/IL-6 son capaces de promover tanto la proliferación como la diferenciación de mioblastos e *in vivo* su administración en el sitio de daño muscular incrementan su regeneración (Florini y col., 1991; Austin y col., 1992; Kurek y col., 1996; Musaro y col., 2001; Musaro y col., 2004).

El análisis efectuado del medio condicionado por el músculo dañado detectó la presencia de las citoquinas IL-6 e IL-1 $\beta$ , pero no de TNF- $\alpha$ ; mientras que en el medio condicionado por músculo no dañado, no se detectó ninguna de las anteriores. En contraposición, IGF-1 fue detectada tanto en MD como en el MnD, pero su concentración fue tres veces mayor en el medio condicionado por músculo dañado

(Figura 21). Estos resultados son por lo tanto consistentes con los datos reportados por diversos autores que muestran que, *in vivo*, en una condición de daño y/o regeneración muscular se liberan factores de crecimiento como IGF-1 y también citoquinas pro-inflamatorias. Asimismo, que IGF-1 está presente normalmente en el tejido muscular (Hayashi y col., 2004).

#### 4. IGF-1 PARTICIPA EN LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA INDUCIDA POR EL MEDIO CONDICIONADO POR MÚSCULO DAÑADO

Dado que en el medio condicionado se detectó IL-6 e IGF-1 y que ambos factores son conocidos reguladores positivos del proceso de regeneración muscular, fueron consideradas entonces como proteínas candidato responsables del efecto miogénico producido por el MD.

Si bien el tamaño molecular de las citoquinas detectadas en MD (IL-6, IL-1 $\beta$  e IGF-1) no coincide con el de la fracción proteica que estimula la diferenciación y proliferación de las CTMr, el hecho que éstas frecuentemente circulan unidas a sus respectivos receptores solubles (Levine, 2004) o bien, asociadas a proteínas de unión como las IGFBP (Firth y Baxter, 2002; Oksbjerg y col., 2004), no descarta que los efectos reportados en este estudio pudieran ser atribuidos a alguna de ellas.

Con el fin de poner a prueba esta posibilidad se procedió a neutralizar la actividad de la IL-6 y el IGF-1 contenidos en el medio condicionado por músculo dañado recurriendo a anticuerpos. El tratamiento con anticuerpo anti-IL-6 no tuvo consecuencias sobre la capacidad del MD de estimular la diferenciación de los

mioblastos  $C_2C_{12}$  y su proliferación (Figura 22 y 23). En contraposición, al neutralizar la actividad de IGF-1, la diferenciación miogénica disminuyó manifiestamente en comparación con lo observado al cultivar los mioblastos  $C_2C_{12}$  con MD (Figura 22). En tanto, el tratamiento del MD con el anticuerpo bloqueador de IGF-1 disminuyó sólo levemente el efecto proliferativo sobre los mioblastos  $C_2C_{12}$  y no alteró el estímulo proliferativo sobre las CTMr (Figura 23). A pesar que no se pudo realizar un control positivo que indicara que el anticuerpo anti-IL6 efectivamente neutralizó la actividad de IL-6 en el MD, estos resultados sugieren que IL-6 no pareciera ser responsable del efecto miogénico, ni del efecto proliferativo asociado al MD; en cambio, señalan que IGF-1 sí participa en la diferenciación miogénica inducida por el MD. Por otra parte, IGF-1 parece contribuir en baja magnitud al estímulo de la proliferación de las células  $C_2C_{12}$ . Estos resultados sustentan la idea que los factores del MD que causan proliferación serían distintos de aquellos que estimulan diferenciación miogénica.

De acuerdo con antecedentes previos, las CTM expresan en su superficie varios receptores para factores de crecimiento (Satomura y col, 1998; Minguell y col., 2001), entre los cuales se encuentran ambas cadenas del receptor para IGF-1 (Gronthos y Simmons, 1995; Raiche y Puleo, 2004). Existen datos acerca del efecto de IGF-1 sobre las CTM, pero en el contexto de la diferenciación de precursores osteogénicos (Walsh y col., 2003; Raiche y Puleo, 2004). Según estos estudios, IGF-1 no tendría efecto sobre la proliferación de las CTM en cultivo, lo que es coincidente con los resultados reportados en esta tesis (Figura 23). Desde el punto de vista de la participación de IGF-1 en la diferenciación hacia linaje miogénico se reporta un único dato que concluye que VEGF, bFGF e IGF-1 inducen la diferenciación miogénica *in vitro* de células

denominadas progenitores multipotentes de la MO (MAPC) (Muguruma y col., 2003). Sin embargo, las células usadas en ese estudio a las cuales denominaron MAPC, antes del tratamiento para inducir su diferenciación miogénica, fueron expandidas en presencia de varios factores, entre otros: insulina, transferrina, dexametasona, ácido ascórbico, EGF, PDGF, por lo que los resultados son de difícil interpretación y resultan no comparables con los de esta tesis.

Con el propósito de confirmar nuestros resultados que sugieren que IGF-1 participa del efecto estimulador de la diferenciación miogénica, se estudió el efecto de IGF-1 exógeno sobre las CTMr. Los resultados señalaron que al incubar a las CTMr con IGF-1, aproximadamente el 3% del total de células tratadas muestra expresión de miosina (Figura 25), no obstante, no fue posible observar células alargadas y multinucleadas como las que se describió al tratar las CTMr con MD. Estos resultados sugieren que si bien IGF-1 tendría efectivamente un papel en la diferenciación miogénica de las CTMr, no es suficiente para conducir el proceso hasta alcanzar el fenotipo terminal propio de una célula muscular esquelética. Por consiguiente, sin duda lo más probable es que sea necesaria la contribución de otros factores presentes en el MD, en cuya acción concertada controlarían parte del complejo proceso de la miogénesis.

## 5. IMPLICANCIAS Y PROYECCIONES

Debido a que las CTM tienen el potencial de diferenciar a múltiples linajes y son fáciles de expandir en cultivo, han generado un gran interés por su potencial uso en medicina regenerativa y terapia génica (Kan y col., 2005; Le Blanc y Pittenger, 2005).

Sin embargo, la frecuencia de incorporación al músculo esquelético que han sido reportadas, pareciera ser insuficiente para el real mejoramiento de la función muscular (Ferrari y col., 2001). No obstante aquello, los hallazgos obtenidos en esta tesis permiten señalar que la diferenciación hacia linaje miogénico de las CTM es factible bajo la influencia de factores producidos o liberados por un tejido muscular dañado, entre estos IGF-1, lo que permite especular que la entrega local de CTM “pre-condicionadas” por estos factores miogénicos o bien el suministro local de estos factores en conjunto con las CTM al músculo puede resultar en una significativa conversión miogénica de las CTM, representado una potencial terapia para la reparación del tejido en enfermedades musculares. Un cabal conocimiento de estas señales asociadas al daño muscular, así también el poner a prueba estas ideas son interesantes puntos de partida para futuras investigaciones. En este contexto el medio condicionado por músculo dañado, implementado en esta tesis, probó ser un buen modelo para el estudio de estos factores producidos o liberados desde un músculo que ha sufrido daño *in vivo* y está en proceso de regeneración.

Finalmente, la integración de estos estudios con aquellos que comprometen a los otros componentes del micro ambiente del tejido muscular permitirá entender íntegramente como éstos participan y controlan la regeneración muscular.

## CONCLUSIONES

Los resultados generados en esta tesis permiten concluir que:

1. Factores solubles provenientes del tejido muscular esquelético dañado son capaces de inducir *in vitro* la formación de células con características morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales de células musculares a partir de las CTM de médula ósea y de las células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.
2. Factores solubles liberados desde el tejido muscular esquelético dañado son capaces además de estimular la proliferación *in vitro* de CTM de médula ósea, de células de origen miogénico (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) y no miogénico (MCF-7, 3T3, fibroblastos).

Estos resultados sugieren que en el músculo dañado en regeneración se producen o liberan factores que inespecíficamente estimulan proliferación y que aparentemente son distintos de aquellos que inducen la diferenciación hacia linaje miogénico de progenitores.

3. La actividad estimuladora de la proliferación y diferenciación miogénica presentes en el medio condicionado por músculo dañado serían de naturaleza proteica y ambas actividades estarían contenidas en una fracción de proteínas de peso molecular aparente  $\geq$  a 50 kDa.
4. De las proteínas candidato estudiadas, los resultados apuntan a que IL-6 no sería responsable del efecto proliferativo ni miogénico asociado a el o los factores

presentes y liberados desde el tejido muscular dañado, mientras que IGF-1 sí contribuiría en la diferenciación miogénica inducida por el MD.

5. IGF-1 produce efectos sobre la diferenciación de las CTM hacia linaje miogénico, sin embargo, éste por si solo no es capaz de generar células con el fenotipo terminal de células musculares. El IGF-1 no tiene efectos sobre la proliferación de CTM, reforzando la noción que el o los factores miogénicos y proliferativos serían diferentes.

Por lo tanto estos resultados nos indican que además del IGF-1, serían varios los factores producidos o liberados desde el tejido muscular dañado los que inducen y finalmente orquestan el proceso de regeneración muscular y que dan cuenta de la diferenciación hacia linaje miogénico de las CTM.

Por otra parte, los datos presentados en esta tesis muestran por primera vez que CTM derivadas de la médula ósea son un blanco apropiado para las señales o factores miogénicos generados después de dañar un músculo esquelético. La profundización del conocimiento acerca de los factores que controlan la regeneración muscular a partir de células progenitoras residentes en el músculo, como de aquellas provenientes de otros tejidos, proporcionará sustento sólido para futuras intervenciones terapéuticas orientadas a la regeneración del tejido muscular.

## BIBLIOGRAFÍA

Abedi, M., Creer, D., Colvin, G., Demers, D., Dooner, M., Harper, J., Weier, H.-U., Lambert, J.-F. y Quesenberry, P.J. 2004. Robust conversion of marrow to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: A multifactorial process. *Exp. Hematol.* **32**: 426-434.

Adams, G.R. y McCue, S.A. 1998. Localized infusion of IGF-1 results in skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* **84**: 1716-1722.

Allen, R.E. y Boxhorn, L.K. 1989. Regulation skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin like factor I, and fibroblast growth factor. *J. Cell Physiol.* **138**: 311-315.

Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A. y Rudnicki, M.A. 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **159**: 123-134.

Austin, L., Bower, J., Kurek, J. y Vakakis, N. 1992. Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *J. Neurol. Sci.* **112**: 185-191.

Bischoff, R. 1986. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev. Biol.* **115**: 140-147.

Bischoff, R. 1994. The satellite cell and muscle regeneration. En: A.G. Engel y C. Franzini-Armstrong (eds), *Myology*. pp 97-118. McGraw-Hill, New York.

Bischoff, R. 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev. Dyn.* **208**: 505-515.

Bittner, R.E., Schofer, C. Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hause, E., Freillinger, M., Hoger, H., Elbe-Burger, A. y Wachtler, F. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.* **199**: 391-396.

Blau, H.M., Pavlath, G.K., Hardeman, E.C., Chiu, C.P., Silberstein, L., Webster, S.G., Miller S.C. y Webster, C. 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science* **230**: 758-766.

Blau, H.M., Brazelton, T.R. y Weimann, J.M. 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function?. *Cell* **105**: 829-841.

Brugge, T. y Jansen, J.A. 2002. In vitro osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone. *Tissue Eng.* **8**: 321-331.

Broussard, S.R., McCusker, R.H., Novakofski, J.E., Klemen, S., Shen, W.H., Johnson, R.W., Dantzer, R. y Kelley, K.W. y cols., 2004. IL-1 $\beta$  impairs insulin-like growth factor I-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor I receptor in myoblasts. *J. Immunol.* **172**: 7713-7720.

Caldwell, C.J., Mattley, R.O., Weller y R.O. 1990. Role of the basement membrane in the regeneration of skeletal muscle. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* **16**: 225-238.

Camargo, F.D., Green, R., Capetenaki, Y., Jackson, K., Goodell, M.A. 2003. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature Med.* **9**: 1520-1527.

Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kappor, N. Meyers, P., Chiareri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E. y Moore M.A. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* **56**: 289-301.

Chargé, S.B.P. y Rudnicki, M.A. 2004. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.* **84**: 209-238.

Chen G. y Quinn L.S. 1992. Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in Mouse crushed muscle extract. *J. Cell Physiol.* **153**: 563-574.

Conget, P.A. y Minguell, J.J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol.* **181**: 67-73.

Conget, P.A. y Minguell, J.J. 2000. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp. Hematol.* **28**: 382-390.

Cornelison, D.D.W. y Wold, B.J. 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **191**: 270-283.

Corbel, S.Y., Lee A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T.R., Blau, H.M. y Rossi, F.M. V. 2003. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nature Med.* **9**: 1528-1532.

Corti, S., Stazzer, S., Del Bo, R., Salani, S., Bossolasco, P., Fortunato, F., Locatelli, F., Soligo, D., Moggio, M., Ciscato, P., Prella, A., Borsotti, C., Bresolin, N., Scarlato, G. y Comi, G. P. 2002. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx Dystrophic Mouse. *Exp. Cell Res.* **277**: 74-85.

Cooper, R.N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M. y Butler-Browne, G.S. 1999. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci.* **112**: 2895-2901.

Dai, W., Hale, S.L., Martin, B.J., Kuang, J.Q., Dow, J.S., Wold, L.E., Kloner, R.A. 2005. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long- term effects. *Circulation* 112(2): 214-23.

De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J.R., Raymackers, J.M. y Luyten, F.P. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J. Cell Biol.* 160: 909-918.

Deng, W., Obrocka, M., Fischer, L. y Prockop, D.J. 2001. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res.* 23: 148-152.

Dreyfus, P.A., Chretien, F., Chazaud, B., Kirova, Y., Caramelle, P., Garcia, L., Butler-Browne, G. y Gherardi, R.K. 2004. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am. J. Pathol.* 164(3): 773-779.

Ferrari, G., Cussela-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. y Mavilio, F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.

Ferrari, G., Stornaiuolo, A. y Mavilio, F. 2001. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature* 411: 1013-1015.

Florini, J.R., Ewton, D.Z. y Coolican, S.A. 1991. Insulin-like growth factor I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol. Endocrinol.* 5: 718-724.

Firth, S.M. y Baxter, R.C. 2002. Cellular actions of the Insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Rev.* 23: 824-854.

Friedenstein A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. y Frolova, G.P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursors cells for osteogenic and hematopoietic tissue. *Transplantation* 6: 230-247.

Fukada, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Tsukihara, H., Yuasa, K., Higuchi, S., Ono. S., Tsujikawa, K., Takeda, S. y Yamamoto, H. 2002. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci.* 115: 1285-1293.

Gajendran, N., Frey, J.R., Lefkovits, I., Kuhn, L., Fountoulakis, M., Krapfenbauer, K. y Brenner, H.R. 2002. Proteomic analysis of secreted muscle components: search for factor involved in neuromuscular synapse formation. *Proteomic* 2: 1601-1615.

García, H., Henríquez, C., Fernández, E., Iñiguez, G., Boris, F., Pizarro F. y Cassorla, F. 1996. GH-IGF axis during catch up growth in small for gestational age (SGA) infants *Journal of Pediatric. Endocrinology and Metabolism* 9: 561-567.

Grounds, M. 1998. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55: 119-126.

Gregory, C.A., Prockop, D.J. y Spees, J.L. 2005a. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell Res.* 306: 330-335.

Gregory, C.A., Ylostalo, J., y Prockop, D.J. 2005b. Adult Bone Marrow Stem/Progenitor Cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci. STKE.* 294: pe37.

Gronthos, S. y Simmons, P.J. 1995. The growth factor requirement of STRO-1 positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 85: 929-940.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M. y Mulligan, R.C. 1999. Dystrophin expression in the mdx Mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**: 390-394.

Hayashi, S., Aso, H., Watanabe, K., Nara, H., Rose, M. T., Ohwada, S. y Yamaguchi, T. 2004. Sequence of IGF-I, IGF-II and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochem. Cell Biol.* **122**: 427-434.

Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. y Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem in vitro. *J. Cell Biochem.* **64**: 295-312.

Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, L., Straszynski, D.M., Meredith, A.F., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P. y McGonagle, D. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* **46**: 3349-3360.

Juan G. y Darzynkiewicz. 1998. Cell cycle analysis by flow and laser scanning cytometry. En *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, vol 1, Ed. J.E. Celis, Academic Press, San Diego, pp 261-274.

Kami, K., Noguchi, K. y Senba, E. 1995. Localization of myogenin, c-fos, c-jun and muscle specific gene mRNA in regenerating rat skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* **280**: 11-19.

Kami, K. y Senba, E. 1998. Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* **21**: 819-822.

Kan, I., Relamed, E. y Offen, D. 2005. Integral therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Curr. Drug Targets* **6**: 31-41.

Kirk, S., Oldham, J., Kambadur, R., Sharma, M., Dobbie, P. y Bass, J. 2000. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J. Cell Physiol.* **184**:356-363.

Kitzmann, M. y Fernández, A. 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblast. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 571-579.

Kurek, J., Bower, J., Romanella, M., y Austin, L. 1996. Leukaemia inhibitor factor treatment stimulates muscle regeneration in the mdx Mouse. *Neurosci. Lett* **212**: 167-170.

LaBarge, M.A. y Blau H.M. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**: 589-601.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lefaucheur J. y Sebille, A. 1995. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscular Disorders* **5**: 501-509.

Lefaucheur, J.P., Gjata, B., Lafont, H. y Sebille, A. 1996. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta. *J. Neuroimmunol.* **70**: 37-44.

Lee, J-H., Kosinski, P.A. y Kemp, D.M. 2005. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp. Cell Res.* **307**: 174-182.

- Le Blanc, K., Pittenger, M. 2005. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 7: 36-45.
- Levine, S.J. 2004. Mechanism of soluble cytokine receptor generation. *J. Immunol.* 173: 5343-5348.
- Li, M., Chan, K., Cai, D., Leung, P., Cheng, Ch., Lee K., Lee K. K. 2000. Identification and purification of an intrinsic human muscle myogenic factor that enhanced muscle repair and regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.* 384: 263-268.
- Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., Marshak, D.R. y Flake, A.W. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Med.* 6: 1282-1286.
- Mauro, A. 1961. Satellite cell f skeletal muscle fibers. *J. Byophys. Biochem. Cytol.* 9: 597-641.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M. y Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387: 83-90.
- Megeney, L.A., Kablar, B., Garret, K., Anderson, J.E. y Rudnicki M.A. 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* 10: 1173-1183.
- Miller, K.J., Thaloor, D., Matteson, S. y Pavlath, G.K. 2000. Hepatocyte growth factor affect satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 278: C174-C181.
- Minguell, J.J., Erices, A. y Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cell. *Exp. Biol. Med.* 226: 1471-1426.

Mitchell, C.A., McGeachle, J.K. y Grounds, M.D. 1992. Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell Tissue Res.* **269**: 159-166.

Montarras, D., Lindon, C., Pinset, C. y Domeyne, P. 2000. Cultured *myf5* null and *myoD* null muscle precursor cells display distinct growth defects. *Biol. Cell* **92**: 565-572.

Mourkioti, F. y Rosenthal, N. 2005. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *TRENDS in Immunol.* **26** (10): 535-542.

Muguruma, Y., Reyes, M., Nakamura, Y., Sato, T., Matsuzawa, H., Miyatake, H., Akatsuka, J.I., Yahata, T., Ando, K., Kato, S. y Hotta, T. 2003. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp. Hematol.* **31**: 1323-1330.

Musaro, A., McCullagh, K. J., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L. y Rosenthal, N. 2001. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* **27**: 195-200.

Musaro, A., Giacinti, C., Borsellino, G., Dobrowolny, G., Pelosi, L., Cairos, L., Ottolenghi, S. Cossu, G., Bernardi, G., Battistini, L. Molinaro, M. y Rosenthal, N. 2004. Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 1206-1210.

Nuebauer, M., Fischbach, C., Bauer-Kreisel, P., Esther, L., Hacker, M., Tessmar, J., Schulz, M.B., Goepferich, A. y Blunk, T. 2004. Basic fibroblast growth factor enhanced PPAR $\gamma$  ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* **577**: 277-283.

Oksbjerg, N., Gondretb, F. y Vestergaarda, M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animal Endocrinol.* **27**: 219-240.

Orlic, D., Kajstura, J., Climenti, S., Jakonluk, I., Anderson, S.M. Li, B., Pickel, J., Mckay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Lerl, A. y Anversa, P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**: 701-705.

Palermo, A.T., LaBarge, M.A., Doyonnas, R., Pomerantz, J. y Blau, H.M. 2005. Bone marrow contribution to skeletal muscle: A physiological response to stress. *Dev. Biol.* **279**: 336-344.

Parker, M.H. Seale, P., y Rudnicki, M.A. 2003. Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Rev.* **4**: 495-505.

Pereira, R.F., Halford, K.W., O'hara, M.D., Beeper, D.B. Sokolov, B.P. Pollard, M.D., Bagasra, O., Prockop, D. J. 1995. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4857-4861.

Peter, S.J., Liang, C.R., Kim, D.J., Widmer, M.S. y Mikos, A.G. 1998. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate and L-ascorbic acid. *J. Cell Biochem.* **71**: 55-62.

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

Prockop, D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science* **276**: 71-74.

Polesskaya, A., Seale, P. y Rudnicki, M.A. 2003. Wnt signalling induce the myogenic specification of resident CD45<sup>+</sup> adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* **113**: 841-852.

Raiche, A.T. y Puleo, D.A. 2004. In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials* **25**: 677-685.

Ratajczak, M.Z., Kucia, M., Majka, M., Reza, R. y Ratajczak, J. 2004. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells: are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem Cytobiol.* **42**: 139-146.

Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M. y Devesa, J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C993-C999.

Sabourin, L.A. y Rudnicki, M.A. 1999. The molecular regulation of miogénesis. *Clin. Genet.* **57**: 16-25.

Santa María, L., Minguell, J.J. y Rojas, C.V. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cell. *Exp. Cell Res.* **300**: 418-426.

Satomura, K., Derubeis, A.R., Fedarko, N.S., Ibakaki-O'Connor, K., Kuznetsov, S.A., Rowe, D.W., Young, M.F., Gehron Robey, P. 1998. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol.* **177**: 426-438.

Schultz, E., Jaryszak, D.L., Valliere, C.R. 1985. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* **8**: 217-222.

Seale, P. y Rudnicki M.A. 2000. A new look at the origin, function and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **218**: 115-124.

Sheehan, S.M., Tatsumi, R., Temm-Grove, C.J. y Allen, R.E. 2000. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* **23**: 239-245.

Shi, D., Reinecke, H., Murry, C.E. y Torok-Storb, B. 2004. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* **104**: 290-294.

Smith, C.K., Janney, M.J., y Allen, R.E. 1994. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Physiol.* **159**: 379-385.

Sugiura, F., Kitoh, H. y Ishiguro, N. 2004. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem. Biophys. Res.* **316**: 233-239.

Suva, D., Garavaglia, G., Menetrey, J., Chapuis, B., Hoffmeyer, P., Berheim, L. y Kindler, V. 2004. Non-Hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.* **198**: 110-118.

Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J. Halevy, O. y Allen, R.E. 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* **194**: 114-128.

Tiffin, N., Adi, S., Stokoe, D., Wu, N-Y. y Rosenthal, S.M. 2004. Akt phosphorylation is not sufficient for insulin-like growth factor-stimulated myogenin expression but must be accompanied by down-regulation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Endocrinology* **145**: 4991-4996.

Todazo, G.J. y Green, H. 1963. Quantitative studies of the growth of Mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17**: 299-313

tissue of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult and geriatric donors. *Anat. Rec.* **264**: 51-62.

Zammit, P.S. y Beauchamp, J.R. 2001. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell. *Differentiation* **68**: 193-204.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, W., Katz, A., Benhaim, P., Lorenz, H. P. y Hedrick, M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**: 211-228.