



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Efecto de Ghrelina y el Fragmento 18 de Ghrelina en la
diferenciación muscular de células satélite de la línea
i28 y cultivo primario de tejido muscular bovino.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

María Denisse Montoya Flores

Director de Tesis:

José Luis Romano Muñoz

Comité Tutorial:

María Ofelia Mora Izaguirre

Armando Shimada Miyasaka

Cuautitlán, Izcalli

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Dios por darme vida y bendiciones cada día.

En memoria de mis queridos abuelos por su cariño y apoyo.

A mis queridos padres, porque siempre me han apoyado y enseñado con su ejemplo y amor para realizar todas mis metas.

A mis queridos hermanos por su apoyo y comprensión.

A mi hijo con amor, por su comprensión y apoyo.

A mi novio por su apoyo.

A mis amigos de siempre y a los nuevos amigos, que tuve la fortuna de encontrar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la valiosa colaboración de las siguientes personas e instituciones en la realización de este trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formar parte de ella.

Al Programa de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme el apoyo económico durante los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento al proyecto 12221, para la realización del presente trabajo.

Al Laboratorio de Rumenología y Metabolismo Nutricional (RuMeN) por su gran colaboración.

Al Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis en el Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su apoyo.

A la Unidad de Proteogenómica del INB de la UNAM, por los servicios y asesorías brindados.

Al comité tutorial: Dr. José Luis Romano Muñoz, Dra. Ofelia Mora Izaguirre y Dr. Armando Shimada Miyasaka, por su constante apoyo, guía y consejos.

A los miembros del H. Jurado: Dr. Enrique Piña Garza, Dra. Teresa Garcia Gasca, Dra. Anaid Antaramián Salas y Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, por sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

A la Dra. Elisa Tamariz Domínguez, por su asesoría e invaluable apoyo.

A los Dres. Ataúlfo Martínez Torres y Ricardo Miledi y Dau del INB de la UNAM, por proporcionarnos la línea celular i28.

A la Dra. Anaid Antaramián Salas y a la M en C. Adriana González Gallardo por sus recomendaciones y conocimientos.

A la M en C. Laura González Dávalos por su amistad, paciencia y apoyo.

A Leticia Jiménez por su orientación y apoyo.

A mis queridos maestros, por sus consejos y confianza.

A mi familia por su cariño, comprensión y apoyo.

A todos mis queridos compañeros y compañeras del laboratorio por su paciencia, consejos y amistad.

A todos mis compañeros de la maestría, por su paciencia, ánimos y solidaridad.

A todos mis amigos, que siempre me dieron su apoyo y palabras de aliento para continuar.

ÍNDICE GENERAL

	RESUMEN	I
	ABSTRACT	II
	ÍNDICE GENERAL	III
	ÍNDICE DE CUADROS	IV
	ÍNDICE DE FIGURAS	IV
1	ANTECEDENTES	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Situación actual de la producción de carne de bovino en México	3
2.2	Miogénesis	5
2.2.1.	Origen de las células precursoras de los mioblastos	5
2.2.2.	Factores de transcripción involucrados en la diferenciación	5
2.2.3.	Diferenciación de mioblastos	6
2.2.4	Células satélite	7
2.3	La Ghrelina	10
2.3.1	El gen de GHRL	11
2.3.2	Fragmentos de GHRL	14
2.3.3	Secreción de GHRL	14
2.3.4	Receptor de GHRL	15
2.3.5	Funciones fisiológicas de GHRL	18
2.3.6	Uso de GHRL exógena	21
3	HIPÓTESIS	22
4	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo general	22
4.2	Objetivos específicos	22
5	ARTÍCULO CIENTÍFICO: Ghrelin stimulates myogenic differentiation in a mouse muscle satellite cell line and in primary cultures of bovine myoblasts	23
6	DISCUSIÓN	55
6.1	Efecto de hGHR y hGHR1-18 sobre la diferenciación muscular en la línea celular i28	55

6.2	Efecto de hGHR y hGHR1-18 sobre la diferenciación muscular en mioblastos de bovino	56
6.3	Comparación entre los mioblastos de bovino e i28	56
6.4	Receptores de hGHR y hGHR1-18	57
7	CONCLUSIONES	59
8	LITERATURA CITADA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Valor de la producción del ganado bovino	4
Cuadro 2.	Consumo Nacional Aparente	4
Cuadro 3.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GHRL en mamíferos.	12
Cuadro 4	Tipos de receptores para GHRL	17
Cuadro 5	Efectos de GHRL y potencial terapéutico de los agonistas y antagonistas.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Familia de factores miogénicos bHLH	9
Figura 2.	Modelo de activación de células satélite.	10
Figura 3.	El gen de GHRL humano	11
Figura 4.	El gen de GHRL en bovino	12
Figura 5.	Estructura de GHRL acilada y el receptor GHSR	13
Figura 6	Receptor CD36	16
Figura 7	Mecanismos de acción de GHRL	19

RESUMEN

La ghrelina es una hormona gástrica acilada de 28 aminoácidos. Se ha reportado que tiene una amplia gama de funciones, incluyendo el control de la ingesta, en el metabolismo energético, en la modulación de la función cardiovascular, regulación a la baja de la diferenciación celular en las células endoteliales, en el desarrollo de los linfocitos, en la secreción de citocinas y en el control de la reproducción, entre otros. Reportes recientes indican que la ghrelina puede modular la proliferación y la diferenciación celular. Se identificó que ghrelina estimula la proliferación de los mioblastos incluyendo su diferenciación y fusión en miotubos multinucleados. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la ghrelina humana (hGHRL) y del fragmento de los aminoácidos 1-18 (hGHRL1-18), sobre la diferenciación de mioblastos bovinos, a través de la cuantificación de la expresión de miogenina por inmunocitoquímica y PCR en tiempo real, utilizando a la línea celular i28 como un modelo de diferenciación; esta línea fue obtenida de músculo esquelético de ratón. En el caso de los bovinos, se emplearon mioblastos aislados del músculo semitendinoso de cinco animales. Las dosis utilizadas fueron de 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 nM de hGHRL y hGHRL1-18. Los tratamientos fueron aplicados en confluencia y se mantuvieron por 4 días. Se estableció que desde 0.1 hasta 100nM de hGHRL y hGHRL1-18 se tiene un efecto positivo en el proceso de diferenciación muscular en la línea celular i28 en comparación con las otras dosis ($P < 0.01$). Por otra parte, las dosis de 10 y 100 nM de hGHRL provocaron un aumento en la expresión de miogenina en los mioblastos bovinos ($P < 0.05$). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la ghrelina podría tener un efecto positivo promoviendo la diferenciación del tejido muscular.

Palabras clave: Ghrelina, fragmento de ghrelina 1-18, mioblastos, bovinos, línea celular i28

ABSTRACT

Ghrelin is a 28 amino acid acylated gastric hormone, with a broad array of reported functions including control of food intake, energy metabolism, modulation of cardiovascular function, down-regulation of cell differentiation in endothelial cells, regulation of lymphocyte development and cytokine secretion and control of reproduction, among others. Emerging evidence has indicated that ghrelin may modulate cell proliferation and differentiation. It has been found that ghrelin stimulates proliferation in myoblast cells leading to differentiation and fusion into multinucleated myotubes. The aim of this work was to study the effect of human ghrelin (hGHRL) and that of the fragment corresponding to amino acids 1-18 (hGRHL1-18), on bovine myoblast differentiation assessing the expression of myogenin by immunostaining and quantitative PCR, using the i28 cell line obtained from mouse skeletal muscle as a model of differentiation. The bovine myoblasts were isolated from semitendinosus muscle from five animals. The doses used were 0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 nM of both compounds. Treatments were applied on confluence and were maintained 4 days. We established that 0.1 to 100 nM of hGHRL and hGRHL1-18 have the same positive effect in the muscle differentiation process in i28 cell line against the lower doses ($P < 0.01$). In the case of bovine myoblasts only 10 and 100 nM of hGHRL have a positive effect on muscle differentiation ($P < 0.05$). The results obtained in this study suggest that ghrelin could promote the differentiation of muscle tissue.

Keywords: Ghrelin, myoblast, bovines, i28 cell line

ANTECEDENTES

El crecimiento de la población es un indicador importante de la demanda de alimentos. De acuerdo a las proyecciones del Consejo Nacional de Población, la tasa media de crecimiento anual (TMCA) de la población en México en 2008 fue de 0.82%, y de 2007 a 2020 se estima una TMCA de 0.7%.

Entre los alimentos que demanda un país en crecimiento, se encuentran los productos cárnicos, el consumo de carne en nuestro país está representado principalmente por la producción de bovinos, cerdos y aves.

El consumo de carne de bovino es el segundo más importante en el país, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) estima que en 2008 se contó con un hato bovino superior a 31.4 millones de cabezas y se procesaron 1,666 millones de toneladas de carne en canal de bovino. La comercialización de carne se incrementó en 193 mil toneladas en el período de 2003 a 2009, de acuerdo con los datos presentados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

La producción bovina de carne es de gran importancia socioeconómica para el país, por lo que es necesario conocer los mecanismos fisiológicos involucrados en crecimiento y desarrollo de los bovinos en cada una de las fases del proceso de producción, tales como la cría, destete y engorda; así como el uso de las técnicas y herramientas que mejoren los parámetros productivos para finalmente promover una producción más eficiente y rentable.

Por ello, resulta necesario buscar productos que puedan ser usados como herramientas tecnológicas en la producción animal. Como parte de esto se realizan estudios enfocados a conocer qué hormonas están involucradas en regular el consumo de alimento. A partir de esto se ha señalado que la ghrelina se relaciona directamente con el inicio del consumo de alimento y que tiene un efecto orexigénico a nivel de sistema nervioso central. Además, estimula la liberación de la hormona de crecimiento. Recientemente se investigó su efecto en precursores de músculo de ratón, encontrando que estimula la formación de nuevas fibras musculares.

Con dichos antecedentes se plantea la importancia de conocer el efecto de ghrelina en las células precursoras de músculo esquelético de especies productivas.

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo conocer el efecto de la ghrelina humana y un fragmento que consta del aminoácido 1 al 18 de la secuencia de ghrelina humana, sobre la diferenciación de mioblastos provenientes de tejido muscular bovino, usando como control positivo de diferenciación la línea celular i28 (obtenida a partir de músculo esquelético de ratón). De esta forma se busca la posibilidad de usar a la hormona ghrelina como promotor de la diferenciación celular en tejido muscular bovino y su eventual uso en la producción de carne.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Situación actual de la producción de carne de bovino en México

La carne de bovino es uno de los productos pecuarios de mayor consumo nacional, gracias a su gran valor nutrimental con alto contenido proteínico, agradable sabor y versatilidad gastronómica. En términos generales, la producción de carne de bovino ha experimentado un crecimiento continuo en el periodo 2000 al 2008, con una tasa media de crecimiento anual de 2.12%. La producción en canal en 2008 alcanzó 1,67 millones de toneladas, lo que significa un crecimiento del 1.82% con relación a la producción del año previo, y una participación del 30% en la producción total de carnes en México. De acuerdo al resumen nacional de producción 2006 y a lo pronosticado para 2012, la producción de carne de bovino continuará creciendo en un 10% de crecimiento acumulado (SAGARPA, 2009).

Aunque la ganadería bovina se localiza en todo el país, se identifican entidades que aportan fuertes volúmenes a la producción nacional; los estados de Veracruz, Jalisco, Chiapas, Chihuahua, Sinaloa, Michoacán y Sonora aportan el 50% de la producción. Se estima que los tres primeros estados mencionados ocupan los primeros lugares con participaciones del 14.4%, 11% y 6.2%, respectivamente, en relación al total de la producción nacional.

El valor de la producción del ganado bovino para pie y canal, durante 2008 se muestra en el Cuadro 1; estos datos reflejan la tendencia del aumento en el precio, en el periodo de 2003 a 2008, el precio promedio al productor se registró en \$14.68 y \$23.69 por kilogramo respectivamente, lo cual representa un incremento de 61.4%. (Financiera Rural, 2009).

El consumo de carne de bovino continúa creciendo y ocupando un papel importante dentro del consumo total de carnes en México, manteniéndose como un eje importante en torno al cual se determinan condiciones del mercado general de cárnicos. Las tendencias en los últimos años, en materia de producción, importaciones, exportaciones, consumo per cápita, consumo nacional aparente (CNA) de carne de bovino en México se resumen en el Cuadro 2 (Financiera Rural, 2009).

Cuadro 1. Valor de la producción del ganado bovino en México 2008.

	Veracruz	Jalisco	Chiapas	Chihuahua	Sinaloa	Nacional
Pie	8,186	5,802	2,794	2,779	2,448	54,097
Canal	7,518	5,574	3,142	2,693	2,594	53,000

Datos en millones de pesos.

(Financiera Rural, 2009)

Cuadro 2. Consumo Nacional Aparente

Concepto	2004	2005	2006	2007	2008
Producción					
Importaciones Mt	1,543	1,558	1,585	1,628	1,667
Importaciones Mt	257	310	351	369	285
Exportaciones Mt	8	20	27	31	27
Población/total	103,001,867	103,946,866	104,874,282	105,790,725	106,682,518
Oferta nacional/ ¹	1,800	1,867	1,936	1,997	1,952
Consumo aparente (ton)/ ²	1,792	1,847	1,909	1,966	1,925
Consumo per cápita (kg)/ ³	17	18	18	19	18

Mt=miles de toneladas

¹/ Oferta nacional = (Producción + Importación)

²/ Consumo nacional aparente = (Producción + Importaciones) – (Exportaciones)

³/ Consumo per cápita = ((Consumo nacional/1000000)/(Población nacional)) Kg por habitante al año

(Financiera Rural, 2009)

2.2 Miogénesis

El desarrollo ontogénico se expresa en forma dinámica a través de una serie de cambios que conducen a la formación de un individuo adulto y están regulados por la expresión o represión génica (Wolpert *et al.*, 1998; Sorisky, 1999). El proceso de diferenciación celular tiene como resultado variados tipos celulares, entre ellos las células musculares, nerviosas, epidérmicas y adiposas (Wolpert *et al.*, 1998).

La formación del músculo esquelético durante el desarrollo embrionario se define como miogénesis (Gilbert, 2000). Este proceso también se realiza en el músculo esquelético maduro para su mantenimiento y reparación (Rosen *et al.*, 1993).

2.2.1 Origen de las células precursoras de los mioblastos

Las células miogénicas se originan de los somitas, los cuales son condensaciones mesodérmicas en forma de bloque, situados en el mesodermo paraaxial a cada lado de la notocorda. A partir de los somitas se forma el esclerotomo, dermatomo y miotomo, de los que derivan respectivamente; la columna vertebral, la dermis y la musculatura esquelética (Larser, 2003). Las células del miotomo se dividen en una doble capa de células precursoras de músculo (mioblastos), llamada dermatomiotoma. En esta última se localizan los mioblastos integrados en la región próxima al tubo neural que posteriormente crearán los músculos epiaxiales y los mioblastos formados en la región distal al tubo neural que producirán los músculos hipoaxiales (Scott, 2005).

2.2.2 Factores de transcripción involucrados en la diferenciación miogénica

Las células del dermomiotomo son inducidas por señales químicas que provocan proliferación, migración de los mioblastos y retrasan su diferenciación hasta localizarse en la posición ventral adecuada. Para especificar a los mioblastos epiaxiales éstos deberán ser estimulados por los factores de transcripción Wnt1, Wnt3a y Sonic hedgehog, mientras que los hipoaxiales son especificados probablemente por la combinación temporal de proteínas Wnt, la proteína morfogenética del hueso (BMP4) y Noggin para activar la transcripción del gen de determinación miogénica 1 (*MyoD*) (Cossu y Borello, 1999). MyoD y Mif5 pertenecen al grupo de factores reguladores miogénicos (MRF, del inglés myogenic regulatory factors) (Carlson, 2005; Scott, 2005).

En los mioblastos hipoaxiales de ratón se expresa el factor de transcripción Pax3, que pertenece a la familia llamada PAX (caja pareada, del inglés Paired box), el cual inducirá la transcripción del gen *MyoD*. En los mioblastos epiaxiales, la proteína *MyoD* es inducida por la proteína *Myf5* (Scott, 2005).

La proliferación en los mioblastos continúa por la presencia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento transformador β . Cuando estos factores están ausentes en los mioblastos, se detiene del ciclo de división celular y simultáneamente se secreta fibronectina en la matriz extracelular para luego unirse a ella el receptor de fibronectina (integrina $\alpha 5\beta 1$) (Scott, 2005). La migración se da a través de la disminución de las β -integrinas, al parecer por la unión de ellas a la proteína MIBP, así mismo se forman contactos focales (Li *et al.*, 1999). Para iniciar la diferenciación en los mioblastos es indispensable la síntesis de la proteína p21, que inhibe el ciclo de proliferación celular, además de la presencia de los factores reguladores miogénicos. El factor de crecimiento similar a insulina activa en los mioblastos, la transcripción de las proteínas actina y miosina (Carlson, 2005).

2.2.3 Diferenciación de mioblastos

En el proceso de diferenciación de los mioblastos, el siguiente paso es la fusión, que consiste en la alineación y adhesión, a través del reconocimiento intervenido por calcio, de moléculas de cadherina M, glucoproteínas de membrana y de las membranas plasmáticas (Carlson, 2005; Scott, 2005). Durante este proceso, Scott (2005) encontró que es indispensable la presencia de la metaloproteinasa (meltrina- α) y del factor de transcripción miogenina. Simultáneamente a esto los núcleos, antes en posición central, emigran a la periferia del miotubo. Una vez terminado lo anterior, se considera al miotubo diferenciado como fibra muscular. Los miotubos en maduración expresan la proteína MRF4. Al finalizar la fusión, se inicia la transcripción de proteínas relacionadas con la contracción muscular como troponina y tropomiosina. Éstas se ensamblan en miofibrillas y, una vez que incrementa su cantidad, se organizan para formar fibras musculares.

La mayoría de los músculos esqueléticos contienen una mezcla de tres diferentes tipos de fibras musculares. Las fibras tipo 1 son de contracción lenta y resistentes

a la fatiga, las fibras tipo 2a son de contracción rápida y son moderadamente resistentes a la fatiga y las fibras tipo 2b son de contracción rápida pero no son resistentes a la fatiga. (Carlson, 2005). La composición de fibras musculares en el músculo esquelético es dinámico y puede cambiar a lo largo de la vida (Chargé y Rudnicki, 2004).

Sin embargo, algunos de los mioblastos precursores quedan en estado quiescente y son los que formarán en el músculo esquelético maduro las células satélite (Alberts *et al.*, 2004). Las células satélite fueron descritas por Mauro (1961), estas células se localizan entre la membrana basal y el sarcolema de una fibra muscular adulta en mamíferos, anfibios, aves y reptiles. Estas células son usualmente inactivas sin embargo, se activan después de una lesión para proliferar y se diferencian en miofibrillas multinucleadas (Chargé y Rudnicki, 2004).

2.2.4 Células satélite

Las células satélite inactivas se han identificado en las miofibrillas donde expresan el factor de transcripción Pax7 que pertenece a la familia llamada PAX (caja pareada, del inglés Paired box), el cual se relaciona con el proceso de proliferación, diferenciación y auto-renovación (Zammit *et al.*, 2006). En el músculo adulto, las células satélite representan el 5% del total de células presentes y, una vez activada la proliferación, aproximadamente el 20% de la nueva población se conserva como célula satélite; sin embargo, esta capacidad de renovación es inversamente proporcional a la edad. Estas células pueden replicarse varias veces, para luego detener el ciclo de división celular y fusionarse a las miofibras dañadas o para formar nuevas miofibras (Seale y Rudnicki, 2000).

El proceso de diferenciación inicia con la interrupción del ciclo de división celular, las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) regulan la transición del ciclo celular formando complejos con ciclinas específicas que controlan la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). La expresión de las proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas (Ckls) p21 y p57 se incrementa al inicio de la miogénesis. De esta manera, se inhiben las Cdks y se favorece la hipofosforilación de Rb (forma inactiva) lo cual produce una interrupción en la fase G1 del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2002).

En los mioblastos, el hecho de dividirse o diferenciarse está controlado por un balance de proteínas reguladoras positivas y negativas del ciclo celular (Walsh y Periman., 1997). Estas proteínas reguladoras son la familia de los factores de transcripción denominados proteínas miogénicas bHLH (básica hélice-asa-hélice; del inglés basic hélix-loop-helix), las cuales tienen una región HLH conservada que es indispensable para formar dímeros con otras proteínas (Figura1) (Puri y Sartorelli, 2000). La familia bHLH incluye a tres grupos de proteínas: las proteínas E (2, 5, 12 y 47), que forman heterodímeros con miembros de la familia MyoD (Megeny y Rudnicki, 1995), tienen la característica de formar una unión estable con la región promotora del DNA, en comparación con un dímero puro de MyoD (Carlson, 2005). El siguiente grupo de proteínas son las MRF (factores de regulación miogénica por sus siglas en inglés, myogenic regulatory factors) presentan un dominio básico responsable de la unión a promotores de diferentes genes musculares en la secuencia consenso Ebox (CANNTG) (Puri y Sartorelli, 2000), además tienen un dominio conservado integrado por histidina y cisteína (H/C) y un dominio hélice (HIII) en el extremo carboxilo terminal (Knoepfler *et al.*, 1999). Los dominios de los extremos amino y carboxilo están relacionados con la activación de las proteínas. (Puri y Sartorelli, 2000), las MRF están conformadas por MyoD, miogenina, Myf-5, MRF4, Mist 1, MASH-1, MASH-2, Twist, SCL y NeuroD. (Megeny y Rudnicki, 1995; Hamamori *et al.*, 1997); por último las proteínas del inhibidor de diferenciación, las cuales se unen a las proteínas E, MyoD y miogenina para formar heterodímeros (Hamamori *et al.*, 1997), estas proteínas inhibidoras tienen mayor afinidad para unirse a MyoD que a otras proteínas (Carlson, 2005).



Figura 1. Familia de factores miogénicos bHLH (Lluís *et al.*, 2006).

Durante la diferenciación, la presencia del factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) es esencial para la expresión de genes musculares (Ludolph y Konieczny, 1995). Naya y Olson (1999), reportaron que la activación de la MAP-Quinasa p38 promueve el inicio de diferenciación miogénica. Los factores de transcripción que presentan una cremallera (zipper) de leucina en el extremo carboxilo terminal, como las proteínas de la familia Myc, son también importantes para la diferenciación muscular (Hamamori *et al.*, 1997).

En el cultivo de mioblastos *in vitro*, la reducción de suero en el medio de crecimiento induce la diferenciación mediante mecanismos de señalización que conducen a la activación de los genes de la familia bHLH. Las proteínas capaces de estimular la diferenciación de los mioblastos son factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y IGF-II) (Florini *et al.*, 1991). Tanto el IGF-I como el IGF-II inducen la vía miogénica por activación del receptor IGF-I (Ewton *et al.*, 1987). Al presentar los mioblastos confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie de cultivo) en un medio con una baja concentración de factores de crecimiento, éstos se diferencian espontáneamente. Durante este proceso, los factores IGF son secretados por los mioblastos al medio de cultivo y con esto inducen a los mioblastos cercanos (Tollefsen *et al.*, 1989; Rosen *et al.*, 1993).

Yablonka-Reuveni *et al.* (2007), proponen un modelo de activación de células satélite basado en los patrones de expresión de factores de transcripción miogénicos (Figura 2). Las células satélites son activadas por factores de crecimiento para entrar en fase de proliferación como mioblastos, los cuales expresan Pax7 y MyoD. Al iniciar la diferenciación, los mioblastos presentan

además de los anteriores a los factores a la miogenina (Myog). En la diferenciación terminal se observa la formación de miofibrillas las cuales exponen la presencia de MyoD y Myog (Yablonka-Reuveni *et al.*, 2007).

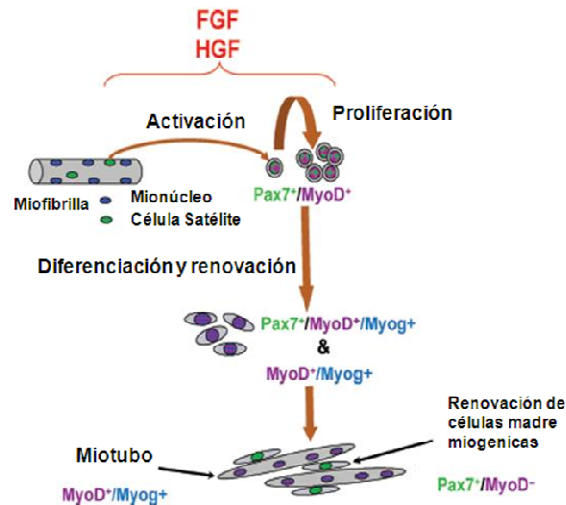


Figura 2. Modelo de activación de células satélite (Yablonka-Reuveni *et al.*, 2007).

2.3 La ghrelina

La hormona ghrelina (GHRL) fue identificada en 1999 por su acción de promover la liberación de hormona del crecimiento (GH), debido a esto toma la raíz "GHRe" que significa crecimiento (Kojima *et al.*, 1999). En animales adultos la mayor producción de GHRL es en las células enteroendócrinas, señaladas como tipo X/A, localizadas en la región fúndica del estómago (Hosada *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2001; Gnanapavan, 2002).

En neonatos y fetos es sintetizada principalmente por el páncreas, ya que en el estómago hay aún una escasa presencia de células X/A (Wierup *et al.*, 2002).

2.3.1 El gen de GHRL

El gen de GHRL está conservado en mamíferos, aves, peces y anfibios (Kishimoto *et al.*, 2003). Este gen en humanos, se localiza en el cromosoma 3 en posición p25-26 y está integrado por 5 exones (Figura 3) (Kanamoto *et al.*, 2004; Pemberton y Richard, 2008). Por otro lado, el gen de GHRL en la especie bovina está situado en el cromosoma 22, se han reportado 2 variantes en Ensembl (por

sus siglas en inglés, European Molecular Biology Laboratory), con identificación GHRL_BOVIN y A6QLN4_BOVIN, el primero incluye 4 exones que codifican para un pro péptido de 116 aminoácidos (aa), la segunda variante está integrada por 6 exones los cuales codifican un pro péptido de 133 aa (Figura 4) (Ensembl, 2010). El RNA mensajero de GHRL en humanos es traducido como el precursor de GHR compuesto de 117 aa, los primeros 23 aa corresponden al péptido señal y los siguientes 94 aa corresponden a proghrelina, de la cual se origina GHR (Korbonits *et al.*, 2004) y obestatina (23 aa) (Zhang *et al.*, 2005).

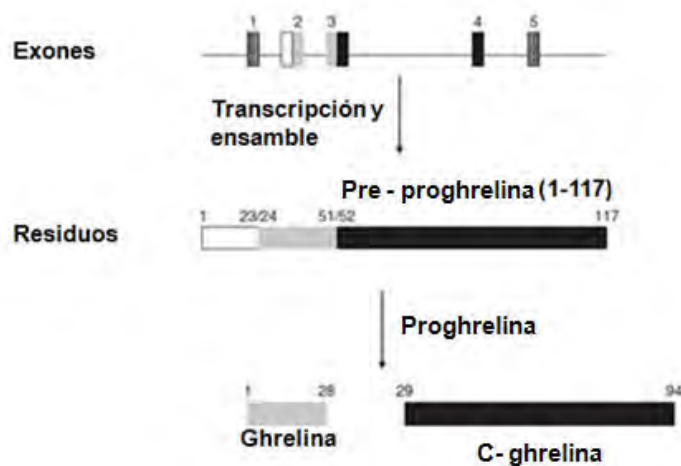


Figura 3. El gen de GHRL humano (Pemberton y Richard, 2008).

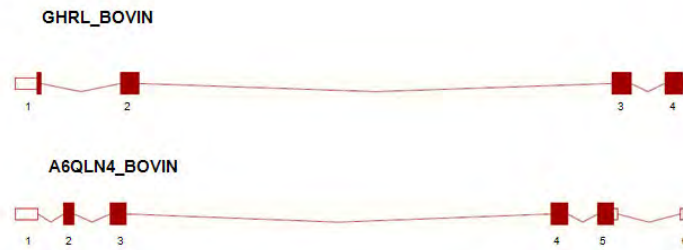


Figura 4. El gen de GHRL en bovino (Ensembl, 2010).

En mamíferos se ha encontrado que los primeros diez aa N- terminales de GHRL son homólogos. Por otro lado, en bovinos y ovinos, la GHRL está formada de 27 aa por la falta de glutamina en la posición 13, debido a un empalme diferente entre los exones 2 y 3 (Cuadro 3) (Pemberton y Richards, 2008).

Cuadro 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GHRL en mamíferos.

Espece	Ghrelina
Humano	GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Rata	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Ratón	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Cerdo	GSSFLSPEHQKVQQRKESKKPAAKLKPR
Perro	GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR
Oveja	GSSFLSPEHQKL-QRKEPKKPSGRLKPR
Bovino	GSSFLSPEHQKL-QRKEAKKPSGRLKPR

(Adaptado de Rindi *et al.*, 2004)

La GHRL presenta una esterificación (n-octanoilación) en la serina ubicada en el tercer aminoácido de la secuencia (Figura 5) (Korbonits *et al.*, 2004; van der Lely *et al.*, 2004; Kojima y Kangawa, 2005). La presencia del grupo acilo se reporta en mamíferos, aves, anfibios y peces. Este grupo acilo en el humano puede ser octanoilado (C8:0), decanoilado (C10:0), y decenoilado (C10:1) (Hosoda *et al.*,

2003). La enzima que realiza la unión del grupo acilo en ratón es ghrelina O-Aciltransferasa (GOAT) localizada en el retículo endoplasmico del tracto gastrointestinal y testículos (Yang *et al.*, 2008). En humanos GOAT transfiere radicales ácido carboxílico, se ha identificado la actividad de la enzima en estómago y páncreas (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Las enzimas involucradas en la desacilación de GHRL que se han identificado son la lisofosfolipasa I (tioesterasa) en estómago (Shanado *et al.*, 2004) y la paraoxonasa asociada a lipoproteína de alta densidad (HDL) en plasma sanguíneo (Beaumont *et al.*, 2003).

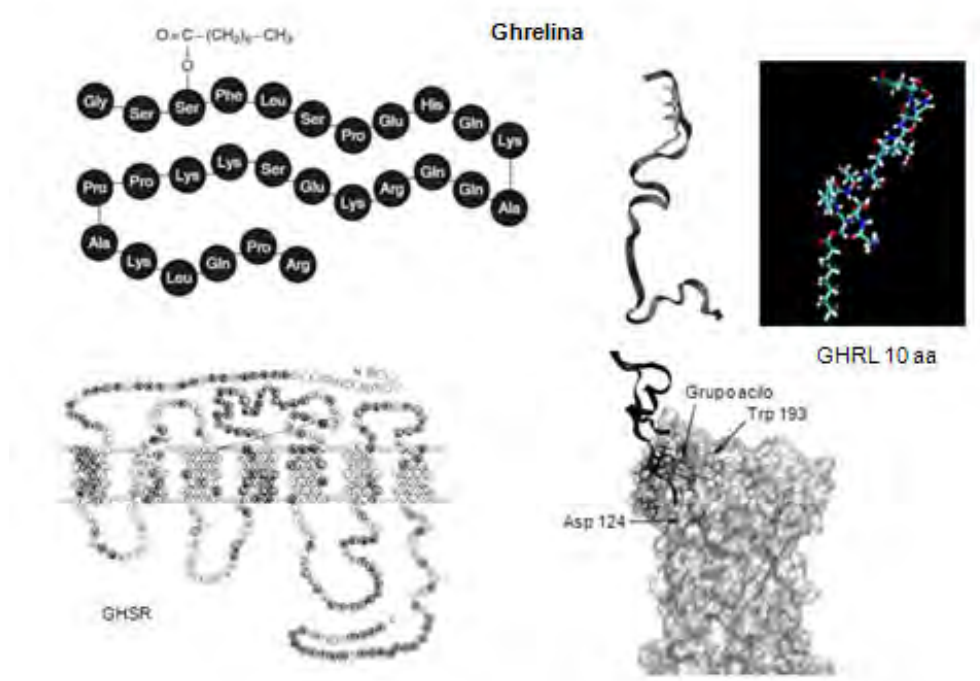


Figura 5. Estructura de GHRL acilada y el receptor GHSR (Kukol, 2008).

2.3.2 Fragmento de GHRL

El grupo acilo en la serina 3 de la molécula de GHRL es esencial para activar a GHS-R1a (Kojima *et al.*, 1999, Hosada *et al.*, 2003). También, los análogos cortos de GHRL (1-5 y 1-10) se han reportado que son aptos para unirse y activar GHS-R1a (Bednarek *et al.*, 2000, Silva *et al.*, 2001). En otro estudio reportan que los siete primeros aminoácidos de la secuencia de GHRL son necesarios para la activación del GHS-R1a (Silva *et al.*, 2001).

2.3.3 Secreción de GHRL

La GHRL es producida en mayor proporción por las células X / A de la mucosa del estómago y en menor cantidad por estas células localizadas en intestino (Date *et al.*, 2000), también, se ha reportado la secreción de GHRL en otros órganos, como páncreas, riñones, placenta, el tejido linfático, tiroides, adrenales, corazón, pulmones, hipófisis, hipotálamo, tejidos neoplásicos y líneas celulares de cáncer. (Gnanapavan *et al.*, 2002; van der Lely *et al.*, 2004; Kojima *et al.*, 2005).

La regulación de la secreción de GHRL aún tiene muchas interrogantes; sin embargo, se reporta que su concentración sanguínea y el RNA mensajero de GHRL se reducen al ingerir alimentos (Cummings *et al.*, 2001) y aumenta en periodos de ayuno (Tschop *et al.*, 2000). La vida media de GHRL es corta a causa de la degradación de su fracción de ácido n-octanoico, por otro lado al analizar los tejidos y plasma es detectable la presencia de GHRL y desacil GHRL (Hosada *et al.*, 2000). La concentración plasmática de GHRL n- octanoilada en humanos es de 10-20 fmol/ml y de 100-150 fmol/ml para ambas formas de GHRL (Cummings *et al.*, 2001; Tschop *et al.* 2001). Por otro lado las concentraciones plasmáticas de GHRL observadas en bovinos una hora antes de recibir alimento fue de >200 fmol/ml, y después de ingerir alimento se encontraron concentraciones de <150 y >150 fmol/ml para 1 y 4 horas, respectivamente (Hayashida *et al.*, 2001).

Las concentraciones plasmáticas totales de GHRL en humanos se correlacionan negativamente con el índice de masa corporal (Tschop *et al.*, 2001). En bovinos no se han realizado investigaciones sobre la relación entre la concentración plasmática de GHRL y el índice de masa corporal.

2.3.4 Receptores de GHRL

En el Cuadro 4 se describen los receptores reportados que interactúan con GHRL o con sus análogos. Los receptores que intervienen en la liberación de GH (GHSR), pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), en estos receptores fue inicialmente que se identificó GHRL. Se han aislado dos tipos de este receptor, el tipo 1a y el tipo 1b (Smith *et al.*, 1999).

El receptor de GHR tipo 1a (GHSR1a) es un polipéptido de 366 aa, presenta una estructura de siete dominios transmembranales (Figura 5). A través de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) en tiempo real fue detectado el RNA mensajero, en hipófisis, tiroides, páncreas, bazo, miocardio y glándula suprarrenal, entre otros (Gnanapavan *et al.*, 2002).

Los mecanismos que se reportan para este receptor en su vía de señalización son modulación alostérica, heterodimerización e internalización del receptor. GHSR1a tiene homología con los receptores Neurotensina (NMU-R1 y R2), el receptor de motilina (GRP38) y GRP39 (Muccioli *et al.*, 2007).

El receptor de tipo GHS tipo 1b (GHS-R1b) es una variante de empalme del GHS-R1a. GHS-R1b es un receptor truncado, consta de 298 aa y de cinco dominios transmembranales, el RNA mensajero en análisis por PCR en tiempo real detectó su presencia en la mayoría de los tejidos en diferente concentración (Gnanapavan *et al.*, 2002). Aunque se reporta como un receptor no funcional, recientemente se describe como un represor de GHS-R1a (Chu *et al.*, 2007), también se ha visto que induce proliferación celular al formar heterodímeros con otros receptores (Takahashi *et al.*, 2006).

Asimismo, se ha identificado al receptor CD36 como una proteína de unión para análogos de GHRL (Bodart *et al.*, 2002). Este receptor es una glicoproteína que pertenece a la familia de receptor scavenger clase B (Figura 6), se expresa en monocitos, macrófagos, células endoteliales, tejido adiposo, músculos cardíaco y esquelético (Hirano *et al.*, 2003)

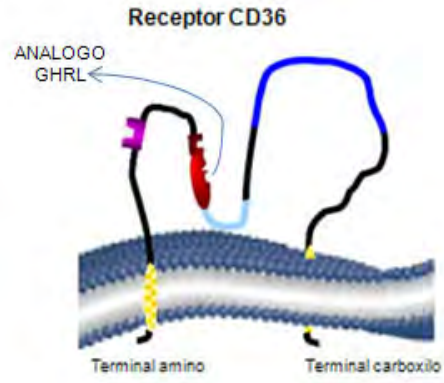


Figura 6. Receptor CD36 (Collot-Teixeira *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Tipos de receptores asociados a GHRL

Tipo de receptor y características	Ligandos	Señalización	Importancia biológica
GHS-R1a Familia A de GPCR Heptahelical (TM1-7) con 366 amino ácidos Actividad constitutiva Homo*/heterodimérico con GPCRs completos	Agonistas: ghrelina y fragmentos cortos del péptido sintético de ghrelina (GHRP-6), GHS parcialmente peptídico y no peptídico Agonistas parciales: Adenosina* Antagonistas: D-Lys ³ -GHRP-6, L765-867, isoxazol, derivados de diaminopirimidina y triazol, cortistatina y su análogo octapeptídico CST-8 Agonistas inversos: sustancia P [D-Arg ¹ -D-Phe ⁵ -D-Trp ^{7,9} -Leu ¹¹]	Gα _q : ↑Ca ²⁺ , PLC, IP3, DAG, PKC ↑ERK1/2, CREB y SRE Bloqueo de canales de K ⁺ ↑cAMP Formación de heterodímeros con receptores de GHRH y dopamina D ₁	↑ Secreción de GH, PRL, CRH, ACTH y glucocorticoides ↓Liberación de GnRH y gonadotropina ↑Apetito, ↑Sinaptogénesis y función de la memoria, neurotransmisión dopaminérgica, actividad locomotora y motivación para comer ↑Crecimiento celular neoplásico ↑Motilidad gastrointestinal y secreción de ácido gástrico ↑Producción hepática de glucosa ↓Secreción de insulina estimulada por glucosa ↓Sensibilidad periférica a la insulina ↓Respuestas pro-inflamatoria e inmune
GHS-R1b Truncado (TM1-5) con 298 amino ácidos Heterodimérico con GPCRs completos	Agonistas: Heterodímero neuromedina en el receptor 1 de neurotensina (NTS-R1)/GHS-R1b	Formación de heterodímero con GHS-R1a y NTS-R1	↓Actividad constitutiva de GHS-R1a ↑Crecimiento celular neoplásico
GHS-Rx_a Sin clonar	Agonistas: ghrelina, UAG y GHS sintético	↑cAMP/PKA, PI3K/AKT, ERK1/2	↑ Neurogénesis ↑Proliferación celular y supervivencia bajo condiciones pro-apoptóticas, ↑Adipogénesis ↓Lipólisis bajo condiciones estimuladas ↓Crecimiento celular neoplásico
GHS-Rx_b Sin clonar	Agonistas: UAG	Desconocido	↑ Consumo de alimento ↓ Producción hepática de glucosa ↑ Secreción de insulina estimulada por glucosa ↓ Sensibilidad periférica a la insulina
CD36 Glucoproteína clase B de la familia de receptores de scavengers, dominio extracelular con dos TMs y 471 amino ácidos	Agonistas: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas Antagonistas: GHS peptídico (hexarelina y su análogo EP-80317)	Consumo de lipoproteínas de baja densidad oxidadas	↑Formación de células espumosas y procesos pro-aterogénicos ↑Angiogénesis y reconocimiento de células inmunes
Supuesto; ↑ y ↓ indican incremento o disminución de la actividad TM = Dominio transmembranal, UAG = Ghrelina desacilada; CREB = Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc; SER = Elemento de respuesta a suero.			

(Adaptado de Muccioli *et al.*, 2007)

2.3.5 Funciones fisiológicas de GHRL

La liberación pulsátil de la GH está regulada por la interacción de las hormonas hipotalámicas; hormona liberadora de GH (GHRH) y somatostatina, vía sus receptores específicos. Además, la liberación de GH *in vivo* también puede ser controlada a través de secretagogos de GH (GHSs), como los péptidos liberadores de GH (GHRP) que se unen al receptor para secretagogos de la GH (GHSR1a), el cual está acoplado a una proteína G.

La hormona GHRL actúa como ligando endógeno para el receptor GHSR1a en la hipófisis, activando a la subunidad alfa de la proteína G para generar diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), simultáneamente IP3 incrementa la concentración intracelular de calcio debido a la activación de canales de calcio tipo L, lo que provoca un bloqueo de canales de potasio y esto a su vez induce la despolarización de los somatotropos y la liberación de GH (Kojima *et al.*, 1999, 2005) (Figura 7).

Además la GHRL ha sido identificada en neuronas hipotalámicas adyacentes al tercer ventrículo, entre los núcleos ventral, dorsal, paraventricular y arcuato. En este último, el consumo de alimento es regulado por las neuronas que expresan péptidos orexigénicos como neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti (AgRP). El efecto de GHRL en las neuronas anteriores activa la liberación de sus péptidos (Figura 7). En contraste en las neuronas que expresan a los péptidos proopiomelanocortina (POMC), hormona estimulante de melanocitos α (α -MHS) y transcritos relacionados con cocaína y anfetamina (CART), GHRL inhibe su liberación. (Horvath *et al.*, 2001; Nakazato *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2005; Date *et al.*, 2006; Gil-Campos *et al.*, 2006; Hosoda *et al.*, 2006). La GHR se une a GHSR1a, la vía de señalización comienza con la proteína G que activa a la enzima adenilato ciclasa (AC) para producir adenosina mono fosfato cíclico (AMPc), este último activa a la proteína cinasa A (PKA) que incrementa la movilización de calcio hacia el interior de la célula y que finalmente estimula la liberación de NPY (Kola *et al.*, 2005).

Con el aumento de calcio intracelular se activa la cinasa dependiente de calmodulina cinasa 2 (CaMKK2), que fosforila a la proteína cinasa adenosina

monofosfato AMPK (Anderson *et al.*, 2008), ésta fosforila e inhibe a la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC), la cual impide la formación de malonil-CoA y activa a la carnitina palmitoyl transferasa-1 (CPT1) (López *et al.*, 2008); como consecuencia aumenta la β -oxidación mitocondrial, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y la proteína desacoplante-2 (UCP2), lo que promueve la transcripción y expulsión de ROS, NPY y AgRP (Andrews *et al.*, 2008). Conjuntamente la GHRL inhibe a las neuronas POMC, al impedir la emisión de α -MSH (Riediger *et al.*, 2003) (Figura 7).

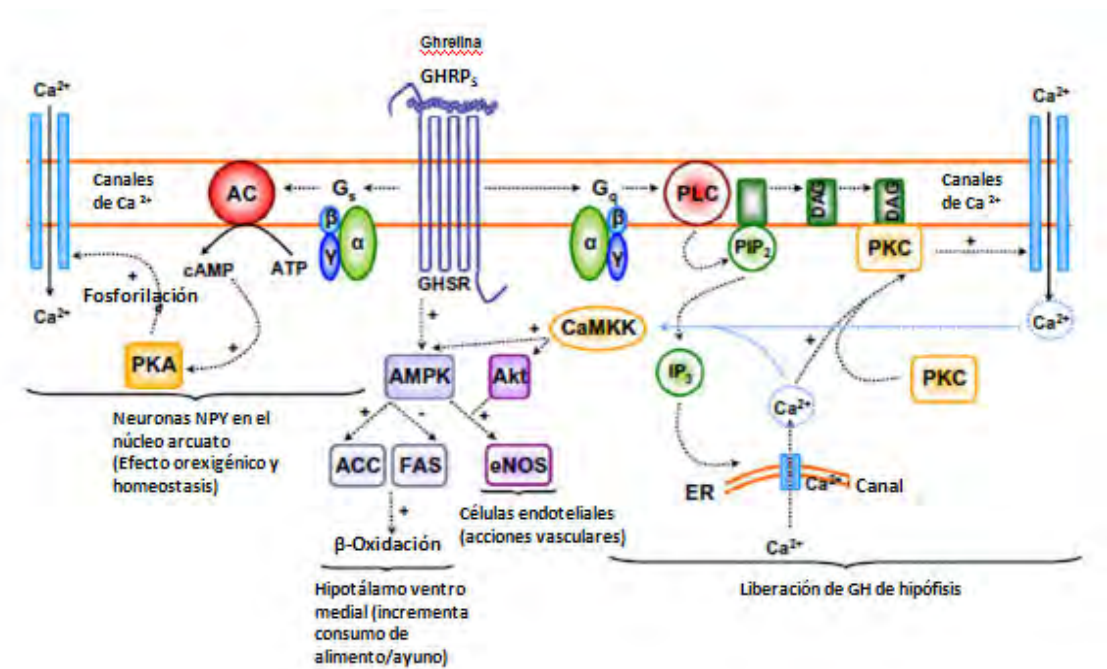


Figura 7. Mecanismos de acción de GHRL (Castañeda *et al.*, 2010).

Además de las funciones señaladas, se reportan diversas acciones fisiológicas y patológicas de GHRL, sus agonistas y antagonistas (Cuadro 5) que podrían ser empleadas con fines terapéuticos (Leite-Moreira *et al.*, 2007).

Cuadro 5. Efectos de GHRL y potencial terapéutico de sus agonistas y antagonistas.

Función	Fisiología y rol patológico	Potencial terapéutico
Liberación de GH	Estimulación de la liberación de GH	GHRL y sus agonista en estados fisiológicos y en el envejecimiento estimulan la liberación de GH
Apetito y ganancia de peso	Estimulación del apetito y la ingesta de alimentos y el incremento de la ganancia de peso	Agonista de GHR en la caquexia y anorexia. Antagonista de GHR en la obesidad.
Metabolismo	Inhibición de la secreción de insulina y su acción; induce a la hiperglucemia; estimula la lipogénesis y la proliferación de linfocitos e inhibe la lipólisis	Agonista de GHRL en los síndromes metabólicos
Reproducción	Inhibe la secreción de LH, el desarrollo embrionario, la espermatogénesis, desarrollo de las células de leydig y la secreción de testosterona	Desconocido
Gastrointestinal	Estimulación de la secreción gástrica; ofrece protección epitelial y estimula la movilidad	Agonista de GHRL en la parálisis gástrica, en úlceras gástricas y en colitis
Cardiovascular	Disminuye la presión sanguínea; mejora la función endotelial, incrementa el volumen sistólico, disminuye el inotropismo, disminuye la apoptosis de los cardiomiocitos y protege contra las lesiones de una isquemia	Agonista de GHRL en la arterioesclerosis, hipertensión, fallo crónico cardíaco, cardiomiopatía dilatada, septicemia y cirugía bypass cardiopulmonar.
Pulmonar	Desconocido	Agonista de GHRL en la hipoplasia pulmonar e hipertensión.
Proliferación de células	Estimula la proliferación en varias líneas celulares normales	Agonistas de GHRL o antagonistas, dependiendo el tumor. Los agonistas de GHRL en la enfermedad asociados con la angiogénesis anormal.
Inmunológico	Mejora la proliferación celular inmunológica e inhibe la secreción de las citocinas proinflamatorias	Agonistas de GHRL y cualquier inmunodeficiencia o en estados inflamatorios así como en enfermedades debilitantes y septicemia.
Hueso	Estimula la proliferación y la función de los osteoblastos	Agonistas de GHRL en la osteoporosis y en la enfermedad metabólica del hueso.

(Adaptado de Leite-Moreira, 2007)

2.3.6 Uso de GHRL exógena

Entre los efectos debidos al empleo de GHRL exógena, se sabe que aplicada por vía intravenosa induce la liberación de GH en ratas y humanos. Además en roedores, la GHRL estimula la ingesta e induce adiposidad tanto a nivel central como periférico (Tschop *et al.*, 2000), como lo señala un estudio en ratas en donde se usó una dosis de 1 nmol/animal, los animales presentaron hiperfagia y aumento en ganancia diaria de peso (GDP) (Wren *et al.*, 2001). Los resultados en animales domésticos son heterogéneos, en novillos al aplicar una dosis de 0.08 µg/kg dos veces al día se registraron diferencias en el consumo de alimento (800 g /día más) sin embargo, la ganancia de peso no presentó diferencias (Wertz-Lutz *et al.*, 2006). En lechones al destete a los cuales se les administró GHRL, a una dosis de 2 µg/kg tres veces al día, no se observó un mayor consumo de alimento pero si mayor GDP (Salfen *et al.*, 2004).

Se ha reportado que algunas de las acciones no endocrinas de GHRL son la modulación de la proliferación y la adipogénesis (Hosoda *et al.*, 2006). Aunque hay controversia entre sí GHRL tiene efecto de inducir diferenciación (Kim *et al.*, 2004) o inhibe diferenciación en líneas celulares de tejido adiposo (Zhang *et al.*, 2004).

En la línea celular C2C12 de tejido muscular, la aplicación de GHRL o desacilGHRL estimularon en los mioblastos la diferenciación y fusión a miotubos (Filigheddu *et al.*, 2007).

Con estos antecedentes se plantea la importancia de conocer el efecto de GHRL (péptido purificado) y el fragmento 1-18 de GHRL (GHRL1-18) (péptido obtenido de síntesis química) en las células precursoras de músculo de especies productivas. Se probaron estos dos compuestos para compararlos entre sí a diferentes concentraciones y con la posibilidad futura de implementar su uso en animales para aumentar la producción de carne.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la GHRL y GHRL1-18 sobre la diferenciación de mioblastos provenientes de tejido muscular bovino, usando como control positivo de diferenciación a la línea celular i28 (obtenida a partir de músculo esquelético de ratón).

3 HIPÓTESIS

El uso de GHRL humana (hGHRL) o su fragmento hGHRL1-18 promoverán la diferenciación *in vitro* de mioblastos de bovino.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes dosis de hGHRL y hGHRL1-18 sobre la diferenciación *in vitro* de mioblastos bovino, usando como modelo de diferenciación a la línea celular i28.

4.2 Objetivos específicos

Estandarizar una técnica para aislamiento y cultivo primario de células satélite a partir de tejido muscular de bovino.

Caracterizar la expresión de miogenina en los mioblastos tanto en los derivados de la línea celular i28 como en los procedentes de tejido muscular bovino en medio de diferenciación.

Evaluar el efecto hGHRL y hGHRL1-18 sobre la expresión de miogenina como indicador de diferenciación muscular en mioblastos de bovino.

1 **Ghrelin stimulates myogenic differentiation in a mouse muscle satellite cell line**
2 **and in primary cultures of bovine myoblasts¹**

3

4 Running head: **Ghrelin in bovine myogenic differentiation**

5 D. Montoya-Flores*‡, O. Mora§², E. Tamariz[#], L. González-Dávalos§, A. González-
6 Gallardo[#], A. Antaramian[#], A. Shimada§, A.Varela-Echavarría[#], and J.L. Romano-
7 Muñoz‡

8 * Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal,
9 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.

10 ‡ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal-
11 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Colón, Qro.
12 76280, México.

13 § Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Secretaría de
14 Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM., Blvd. B. Quintana 514-
15 D, Col. Arboledas, Querétaro, Qro. 76140, México.

16 # Instituto de Neurobiología, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, Qro. 76230,
17 México.

18 **ABSTRACT**

19 Ghrelin is an acylated hormone, reported to influence food intake, energy metabolism,
20 modulation of cardiovascular function, down-regulation of cell differentiation in
21 endothelial cells, regulation of cytokine secretion as well as lymphocyte development
22 and reproduction. Emerging evidence indicates that ghrelin may also modulate cell

¹ This study was supported by a grant from CONACYT (Project 12221) and PAPIIT IN200910.

² Corresponding author: ofemora66@unam.mx, ofemora2001@yahoo.com.mx

1 proliferation and differentiation, and it is known to stimulate proliferating myoblast cell
2 differentiation and multinucleated myotube fusion. The aim of this work was to study
3 the effect of human ghrelin (hGHRL) and human ghrelin fragment 1-18 (hGHRL1-18)
4 on myoblast differentiation, measuring the effect of different concentrations on
5 myogenic differentiation by analyzing myogenin expression at the mRNA and protein
6 level. Two types of cells were tested, the cell line i28 obtained from mouse skeletal
7 muscle and primary cultures of bovine myoblasts. Both ghrelin and its N-terminal
8 fragment hGHRL1-18 were used at concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 nM.
9 Treatments were applied to pre-confluent cultures and were maintained for 4 days. We
10 determined that at concentrations between 0.1 and 100 nM, hGHRL and hGRHL1-18
11 had the same effect on myogenic differentiation of i28 cells. On the other hand, only the
12 higher concentrations (10 and 100 nM) of hGHRL stimulated bovine myoblast
13 differentiation. These results could be attributed to the presence, in both i28 cells and in
14 bovine myoblasts, of the mRNA for GHS-R1a and CD36 receptors. Hence, hGHRL
15 might be useful in beef cattle production by promoting muscle differentiation.

16 Key words: **Ghrelin, myoblast, bovines, i28 cell line**

INTRODUCTION

1
2 Ghrelin is an acylated hormone initially identified in stomach cells which induces the
3 release of growth hormone from the pituitary (Demers et al., 2009). Acyl ghrelin was
4 identified as the endogenous cognate ligand for the growth hormone secretagogue
5 receptor, GHS-R1a (Kojima et al., 1999). Evidence suggests that GHS-R1a alone could
6 be responsible for all acyl ghrelin and GHS-mediated effects on food intake, gut
7 motility, glucose and lipid metabolism, cell proliferation, and reproduction (Chen et al.,
8 2009). Some reports have shown that deacyl-ghrelin and hexarelin are ligands for the
9 CD36 receptor in myocardium or microglial cells (Avallone et al., 2006; Bulgarelli et
10 al., 2009). Xie et al. (2004) demonstrated that ghrelin, either full-length or an N-
11 terminal fragment, enhances growth in rats; Barazzoni et al. (2005), showed that ghrelin
12 induces changes in expression of genes involved in mitochondrial and lipid metabolism
13 in skeletal muscle and favors triglyceride deposition in liver rather than in skeletal
14 muscle. The same authors demonstrated that ghrelin is a novel, tissue-specific
15 modulator of lean tissue and that it acts by serine/threonine protein kinase family (AKT)
16 signaling (Barazzoni et al., 2010). Furthermore, two groups have shown that ghrelin
17 promotes myogenesis *in vitro* in the mouse myoblast cell line C2C12, which does not
18 express GHSR-R1a but does contain a high-affinity binding site recognized by both
19 acylated and de-acylated ghrelin (Filigheddu et al., 2007; Zhang et al., 2007). These
20 novel roles of ghrelin in lean tissue, fat distribution, and metabolism could be applied in
21 meat production to promote myogenesis (Filigheddu et al. 2007; Zhang et al., 2007),
22 metabolic adaptation of myocytes (Barazzoni et al., 2010), or both. The goal of the
23 present work is to study the effect of ghrelin or the ghrelin fragment 1-18 on bovine
24 myoblast differentiation by testing the effect of different concentrations on myogenin

1 expression using primary cultures from bovine muscle and the mouse cell line i28 as
2 differentiation models.

3 MATERIAL AND METHODS

4 *Animals*

5 The experimental protocol was approved by the Universidad Nacional Autónoma de
6 México Animal Care Advisory Committee. Five male Holstein calves less than 1 week
7 old, without food deprivation were killed by captive bolt gun, followed by
8 exsanguination. Samples of semitendinous muscle (around 100 g) were immediately
9 collected. All procedures were carried out in accordance with the Mexican Federal laws
10 for animal care (SAGAR, 1997).

11 *i28 myoblast cultures*

12 The i28 myoblast cell line, obtained from mouse skeletal muscle (Irintchev et al., 1997)
13 was donated by Dr. Ricardo Miledi (Neurobiology Institute-UNAM, Querétaro,
14 México). These cells were used as a positive control of differentiation. Cells were
15 cultured in a 75-cm² flask with proliferation medium, which consists of Dulbecco's
16 Modified Eagle's Medium High Glucose 1x (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA), with
17 20% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 1% amphotericin B (Fungizone 250 µg/mL),
18 1% Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml Penicillin, 10,000 µg/ mL Streptomycin),
19 0.1% Gentamicin (50 mg/mL) and 2 mM L-Glutamine (200 mM). All medium
20 components were from Invitrogen, and the medium was changed every other day until
21 the cells reached 70% confluence. Cells were then trypsinized (0.05% trypsin solution)
22 and plated in proliferation medium at a density of 5000 cells per well in culture dishes
23 with 4 or 24 wells previously coated with 0.1% Type A gelatine from porcine skin
24 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). When the cells reached 80% confluence, the medium

1 was changed to differentiation medium (DM: DMEM + 2% FBS), and treatments were
2 applied.

3 ***Bovine myoblast isolation and culture***

4 Myoblasts were isolated from semitendinous muscle using a modified version of the
5 protocol reported by Dodson et al. (1986). After sacrifice, a sample of semitendinous
6 muscle was taken from each animal and placed in DMEM at 37°C. Each sample was
7 washed twice with Dulbecco's phosphate saline balanced solution at 4°C (D-PBS,
8 Sigma-Aldrich), connective tissue was removed, and muscle was excised and cut into
9 small pieces with scissors. The tissue was incubated for 1 h at 37°C with 1 g/L pronase
10 E (Sigma-Aldrich) in D-PBS, and then centrifuged at 1500 X g for 12 minutes. The
11 supernatant containing the enzyme was discarded, and the pellet was resuspended in D-
12 PBS and homogenized. In order to eliminate the tissue debris and to separate
13 fibroblasts, differential centrifugation at 500 X g for 10 minutes was performed. The
14 supernatant was transferred into a new tube, and the pellet was resuspended again in D-
15 PBS; this procedure was repeated twice. The three supernatants were combined and
16 further centrifuged at 1500 X g for 6 minutes; the pellets were resuspended in
17 proliferation medium and passed through a 40-µm filter (BD Falcon, Franklin Lakes,
18 NJ). Cells were grown in proliferation medium at a density of 20,000 cells per well on
19 24-well culture dishes previously coated with porcine skin gelatin. Cells were
20 maintained in proliferation medium for four days until reaching a pre-confluent state
21 (day 0). On the fifth day, the medium was changed to DM, and the experimental
22 treatments were applied.

23 ***Samples and experimental treatments***

1 Increasing concentrations (0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 nM) of human ghrelin (hGHRL;
2 Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA) or the human ghrelin fragment 1-18
3 (hGHRL1-18, Peptides International, Inc., Louisville, KY) were used. After reached
4 confluence, the i28 mouse cell line and bovine cell cultures were maintained for another
5 four days in DM with the treatments. Cell experiments were repeated three and five
6 times for i28 cells or bovine myoblasts, respectively. For each concentration eight wells
7 were used, four for quantitative PCR (qPCR) and the other four for immunostaining.

8 ***Pax7 immunostaining***

9 Cultured cells were fixed with 3.5% paraformaldehyde in PBS, washed extensively with
10 PBS, and blocked with 2% pre-immune goat serum (Gibco, Auckland, NZ) in PBS.
11 Cells were incubated with mouse monoclonal Pax7 antibody (Abcam, Cambridge, MA)
12 (1:200) in 2% pre-immune goat serum and 0.1% Triton X-100/PBS (J.T. Baker,
13 Phillipsburg, NJ). After extensive PBS rinses, primary antibody was detected with
14 Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:600, Invitrogen). Cells were
15 routinely counterstained and mounted with Hoechst (10 µg/ml, Invitrogen), using a
16 solution of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Dabco, Sigma-Aldrich) in glycerol.
17 Identification was done using an epifluorescence microscope (Olympus, Melville, NY)
18 equipped with a digital color camera and Image Pro Plus software (Media cybernetics,
19 Bethesda, MD).

20 ***Detection and measurement of myogenin***

21 Differentiation of satellite cells was monitored, for both the i28 cell line and the primary
22 culture of bovine cells, by the expression of myogenin using immunostaining, and
23 monitoring the expression of myogenin mRNA by qPCR. These procedures were
24 performed over the course of the differentiation process (six days) in cultures treated

1 with DM, used as a positive control of differentiation, or treated with ghrelin or its
2 fragment.

3 ***a) Myogenin immunostaining***

4 Cultures were fixed with 3.5% paraformaldehyde in PBS, washed extensively with
5 PBS, and blocked with 2% pre-immune goat serum in PBS. Cells were incubated with
6 mouse monoclonal anti-myogenin antibody (1:1000, Millipore, Temecula, CA) in 2%
7 pre-immune goat serum and 0.1% Triton X-100/PBS. After extensive PBS washes,
8 primary antibody was detected with an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody
9 (1:600, Invitrogen). Cells were routinely counterstained and mounted with Hoechst (10
10 µg/ml, Invitrogen) using a solution of DABCO in glycerol. Cells were observed and
11 photographed in an epifluorescence microscope as above.

12 ***b) Myogenin detection by conventional PCR***

13 ***RNA isolation***

14 Total RNA was extracted from cells after various treatments with the RNeasy Mini Kit
15 (Qiagen, Austin, TX) according to the manufacturer's protocol; total RNA was eluted in
16 30 µL of RNase-free water and stored at -70°C to be used in subsequent experiments.

17 Myogenin expression as an indicator of muscular differentiation, (Filigheddu et al.,
18 2007; Zhang et al., 2007) was detected by reverse transcription-polymerase chain
19 reaction (RT-PCR). Single-strand cDNA was synthesized according to the
20 manufacturer's instructions. RT was carried out using oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Sigma-
21 Genosys, St. Louis, MO) and Super script II reverse transcriptase (Invitrogen).

22 Primers for mouse myogenin mRNA were: forward 5'-
23 GCAATGCACTGGAGTTCGGTC-3'; reverse 5'CGTCTGGGAAGGCAACAGACA-
24 3'. Bovine myogenin mRNA primers were: forward 5'-

1 GGGCGTGTAAGGTGTGTAAG-3'; reverse 5'-GCGCTCTATGTACTGGATGG-3'.
2 PCR was performed using Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification
3 parameters consisted of initial denaturation at 94°C for 2 min; denaturation at 94°C for
4 45 s, annealing at 65°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, for 40 cycles. The
5 products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized with Syber green I
6 (Invitrogen).

7 ***c) Quantitative PCR (qPCR)***

8 Myogenin expression was assessed by qPCR using samples taken from five Holstein
9 calves and three different cultures of i28 cells. Samples of cDNA were obtained from
10 i28 cells cultured under different experimental conditions and tested by real-time
11 quantitative PCR (LightCycler[®] 1.5, Roche Diagnostics; Basel, Switzerland). The
12 primers used were:

13 Mouse myogenin: forward 5'- GCAATGCACTGGAGTTCGGTC-3'; reverse 5'-
14 GGGCGTGTAAGGTGTGTAAG-3';

15 Bovine myogenin: forward 5'- GGGCGTGTAAGGTGTGTAAG-3'; reverse 5'-
16 GCGCTCTATGTACTGGATGG-3';

17 Both fragments were amplified using Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green
18 I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) and 20 µL LightCycler Capillaries (Roche
19 Applied Science). In order to normalize for the amount of cDNA, glyceraldehyde 3
20 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified as housekeeping gene; the primers
21 used were: forward 5'TGAAGGTCGGAGTGAACGGATT and reverse 5'-
22 CCTTGACTGTGCCGTTGAACTT-3'. For bovine cells, cyclophyllin A (PPIA) was
23 amplified to normalize for the amount of cDNA; the primers used were: forward 5'-
24 AGCACTGGGGAGAAAGGATT3' and reverse 5'-AGCCACTCAGTCTTGGCAGT-

1 3'. The qPCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 10 min. Amplification
2 for 60 cycles: denaturation at 94°C for 10 s, 20°C/s, annealing at 65°C for 8 s, 20°C/s,
3 and extension at 72°C for 10 s, 20°C/s. One cycle melting: denaturation at 95°C for 0 s,
4 20°C/s; annealing at 55°C for 0 s, 20°C/s, and melting curve at 95°C for 0 s, 0.25°C/s;
5 cooling at 40°C for 0 s, 20°C/s.

6 In order to use the relative quantification formula $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$, the following cDNA curves
7 were carried out for each pair of primers. Duplicate cDNA curves were obtained for
8 mouse myogenin (i28 cells) and GAPDH using cDNA dilutions of 1:5, 1:50, and 1:500,
9 and the efficiencies (E) were 1.948 and 1.888, respectively.

10 cDNA curves for bovine myogenin and cyclophyllin were obtained using cDNA
11 dilutions 1:5, 1:50, and 1:500 (each in duplicate). The E values were 1.922 and 1.904
12 for myogenin and cyclophyllin, respectively.

13 Sequencing:

14 The identity of PCR products was confirmed by sequencing in a 310 ABI prism
15 sequencer with version 3 Big Dye by Applied Biosystems (Carlsbad, CA).

16 ***Ghrelin receptor expression***

17 Samples treated with hGHRL or hGHRL1-18 were tested for the presence of GHS-R1a
18 and CD36 by conventional PCR.

19 GHS-R1a primers were: forward 5'-TTGGGCGACCTGCTCTGCAA-3'; reverse 5'-
20 GGGTCGGTGCCATTCTCATGCT -3'. CD36 primers were: forward 5'-GCTGTG
21 TTTGGAGGGATTCTAA -3'; reverse 5'-AACTGATAGCGAGGGTTCAAAG-3'.

22 **Statistical analyses**

23 ***Myogenin immunostaining***

1 Samples of i28 cells (n=3) and bovine myoblasts (n=5) were analyzed, counting three
2 cover slides of each treatment. For each slide, five fields were registered to detect
3 Hoechst-stained nuclei and myogenin-positive cells to quantify the total number of cell
4 nuclei and the percentage of myogenin-positive cells. The quantification was performed
5 in merged images using Photoshop 7 software (Adobe Systems Inc., San José, CA).
6 Means were analyzed using a model for a completely randomized design. The data were
7 analyzed using the general linear models procedure of SAS (2008), and Tuckey's
8 multiple comparison test was used to obtain and analyze treatment means. Values with
9 $P \leq 0.05$ were considered to be significant.

10 ***Myogenin mRNA detection by qPCR***

11 The abundance of mRNA for myogenin and GAPDH (for i28 cells) or PPIA (for bovine
12 myoblasts) were analyzed using a model for a completely randomized design. Data was
13 analyzed using the general linear models procedure of SAS (2008), and the LSMEANS
14 multiple comparison test was used to obtain and analyze treatment means. Results with
15 $P \leq 0.05$ were considered to be significant.

16 **RESULTS**

17 ***A high proportion of cells from primary cultures of semitendinous bovine muscle*** 18 ***express Pax7.***

19 During *in vitro* differentiation, mammalian myogenic cells undergo several stages that
20 can be distinguished by a well-defined set of molecular markers. Green et al. (2007)
21 showed that quiescent muscle stem cells (also known as satellite cells) express Pax7.
22 First, they become activated and give rise to proliferating myogenic precursor cells
23 (MPCs or myoblasts), which indicates their commitment to the myogenic lineage. Pax7

1 is selectively expressed by myoblasts or satellite cells. To determine whether cells
2 obtained from bovine muscle were also Pax7-positive, we performed immunoassays.

3 A high proportion of bovine muscle cells showed Pax7-positive immunostaining in
4 primary culture at day 0 of treatment with differentiation medium (Fig 1 A-C). In
5 similar cultures, we detected myogenin in less than 5 % of the cells (Fig 1 D-F),
6 confirming that the majority of the cells in the primary cultures were myoblasts. The
7 expression of myogenin in myoblast cultures after differentiation treatment was
8 confirmed by PCR. The PCR products of the myogenin, PAX7, GAPDH, and PPIA
9 genes are shown in Fig 1G.

10 ***Characterization of myogenic differentiation of bovine primary cultures***

11 Myogenin is a protein necessary for the formation of new myofibrils. In the present
12 work, myogenin was used as an indicator of late muscle differentiation. To characterize
13 the dynamics of expression of myogenin mRNA and protein in the bovine primary
14 cultures, we performed either qPCR or immunocytochemistry in pre-confluent cultures
15 treated with differentiation medium for several days. As a positive control of myogenic
16 differentiation, we used the myoblast cell line i28. Preliminary experiments in i28 cells
17 and bovine myoblasts were conducted to determine the optimal time for the various
18 treatments (data not shown). Myogenin expression increases at a linear rate during the
19 differentiation treatment, beginning to decline after six days of treatment. The equations
20 obtained for i28 cells were: $y = 3.41x - 3.83$ ($R^2 = 0.87$, $P < 0.001$) and $y = 3.62x + 0.16$
21 ($R^2 = 0.73$, $P < 0.001$) for immunostaining and qPCR, respectively. In the case of bovine
22 myoblasts, the equations were: $y = 3.14x + 3.84$ ($R^2 = 0.96$, $P < 0.01$) and $y = 4.10x + 2.50$
23 ($R^2 = 0.86$, $P < 0.01$) for immunostaining and qPCR, respectively. In both cases y is equal
24 to myogenin expression and x represents the days. These results gave us confidence that
25 after four days of treatment in DM, we could detect myogenin expression and that the

1 expression increased linearly for both i28 and bovine myoblasts until the end of the
2 experiment.

3 ***Effect of ghrelin and ghrelin fragment on myogenic differentiation of i28 cells***

4 Human ghrelin and hGHR1-18 were assayed in pre-confluent i28 cells cultured with
5 differentiation medium. Differentiation to muscle cells was evaluated by detecting
6 myogenin mRNA and protein using qPCR and immunostaining, respectively. Cells
7 grown in differentiation medium without hGHRL or hGHRL1-18 were used as a
8 positive control, and cells grown in proliferation medium were the negative control
9 (data not shown).

10 The ghrelin fragment, tested as a truncated variant consisting of the first seven residues
11 of ghrelin, was shown to have growth-enhancing effects in rats similar to those of full-
12 length ghrelin (Xie et al. 2004). Phase-contrast microscope images show confluent
13 cultures after four days of the different treatments (Figure 2C-L); in all cases numerous
14 aligned, elongated cells were observed with morphology similar to that of cells in the
15 positive control media (DM) (Figure 2A). Figure 2, panels M-V show myogenin
16 immunostaining after 4 days of treatment with hGHRL or hGHRL1-18 at various
17 concentrations; a dose-dependent increase in myogenin expression can be appreciated as
18 compared to the positive control (Fig. 2 B). At concentrations as low as 0.1 nM, both
19 hGHRL and hGHRL1-18 increased myogenin expression. Quantification of the
20 percentage of i28 cells expressing myogenin (Figure 3A) showed that 0.01 nM hGHRL
21 or hGHRL1-18 had no effect, but myogenin expression was significantly increased at
22 0.1 nM ($P < 0.01$). Similar results were obtained when myogenin expression was
23 evaluated by qPCR (Figure 3 B, $P < 0.01$).

24 ***Ghrelin and ghrelin fragment enhance myogenic differentiation of bovine myoblasts***

1 Pre-confluent primary cultures of bovine myoblasts were treated with hGRHL or
2 hGHRL1-18 in DM medium for four days. Panels A and C-L in Figure 4 show images
3 of the control and treated cultures, respectively. Numerous confluent cells were
4 observed, and on top of them several myotubes were already present in both control and
5 treated cultures. Immunostaining for myogenin showed an increase of myogenin
6 expression only in treated cultures (Figure 4B and 4M-V), with several aligned,
7 myogenin-positive nuclei within multinucleated myotubes. Quantitation of the
8 percentage of cells that expressed myogenin by immunostaining and qPCR shows that,
9 in the case of the bovine myoblasts, the percentage of myogenin-positive cells was
10 larger than in control cultures only with 100 nM hGHRL ($P<0.01$) (Figure 5A).
11 Myogenin mRNA expression (Figure 5B) was different at 10 nM hGHR, but the lower
12 concentrations were ineffective ($P<0.05$). To prove that the process of final muscle
13 differentiation in bovine myoblasts was proceeding normally, and to confirm the
14 presence of multinucleated myotubes, immunocytochemistry was performed to detect
15 the presence of myogenin in the nuclei and actin alongside the myotubes in cells kept
16 for seven days in differentiation medium (Figure 6 A-E).

17 ***Ghrelin receptor expression***

18 In both i28 cells and in bovine myoblasts, mRNA for the GHS-R1a and CD36 receptors
19 was detected by conventional PCR (Figure 7 A-B). Expression of mRNA for the
20 receptors GHSR1a and CD36 was measured by qPCR in i28 cells and bovine myoblasts
21 treated only with differentiation medium (DM in Figure 7 C and D) and compared to
22 that in mouse and bovine middle brain. GHSR1a mRNA is more abundant in brain and
23 CD36 in muscle (Figure 7 C and D).

1 Furthermore, to test the differences between hGHRL and hGHRL1-18 receptor
2 expression, we performed qPCR with RNA from bovine myoblasts treated with all
3 concentrations used of hGHRL or hGHRL1-18 (n = 5). Treatment with 0.01 nM
4 hGHRL1-18 increased GHSR1a significantly ($P < 0.05$, 2.2 fold) compared with DM;
5 however, all the other treatments were equal to DM. In the case of CD36, no differences
6 were found between treatments ($P > 0.05$), a result that does not help us to explain the
7 differences in myogenin expression induced by hGHRL.

8

9

DISCUSSION

10 *Pax7 expression*

11 The factor Pax7 is a member of a large family of Pax transcription factors involved in
12 cell type and organ determination during embryogenesis of multicellular animals. It is
13 known that both Pax3 and Pax7 are expressed during muscle development, and they
14 possess both distinct and overlapping roles. At first, Pax7 appeared to be required to
15 specify satellite cells; however, these cells have been detected in the early postnatal
16 period in Pax7-null mice, and their numbers have been shown to decline rapidly,
17 presumably due to apoptosis, thus impairing muscle maintenance. Hence, Pax7 is likely
18 to be involved in satellite cell survival. Pax3 cannot compensate for the essential role of
19 Pax7 in postnatal muscle, although embryonic muscle development progresses normally
20 in the absence of Pax7 (Oustanina et al., 2004, Yablonka-Reuveni et al., 2007). Zammit
21 et al. (2006) have shown that Pax7 is present in cultured cells from bovine
22 semitendinous muscle. We achieved similar results by isolating quiescent satellite cells
23 which, when cultured in basal medium, were stimulated to begin cell division and to
24 become active myoblasts (Figure 1 A-C). Furthermore, the presence of myogenin on
25 day 0 in myoblasts cultured in DM may reflect the fact that the cells had reached

1 confluence prior to treatment; this may indicate that myogenin is spontaneously induced
2 in muscle differentiation (Rosen et al., 1993) (Figure 1 D-F).

3 ***Characterization of myogenin expression***

4 Myogenesis is a complex, highly coordinated process that relies on precise, temporal
5 patterns of gene expression. It requires multiple interactions between diverse cellular
6 processes involving growth factors, hormones, receptors, kinases, and histone
7 deacetylases (Tomczak et al., 2004). Myogenin is a late marker of myogenesis and is
8 involved in the differentiation process itself, in myotube formation, and in the synthesis
9 of the contractile apparatus (Ferri et al., 2009). Our results are consistent with
10 experiments reported by Ferri et al. (2009) that showed an increase in myogenin
11 expression in C2C12 cells between days 3 and 5 of treatment with DM.

12 ***Myogenin expression in i28 cells***

13 Filigheddu et al. (2007) showed that treating C2C12 myoblasts for three days with 10
14 nM exogenous ghrelin in differentiation medium induced increases in differentiation,
15 measured by the expression of myogenin, and in the fusion index compared to control
16 cultures. Zhang et al. (2007) found that 100 nM exogenous ghrelin increased the
17 expression of MyoD and the myogenesis index in C2C12 myoblasts, relative to control
18 cultures. Our results show that lower concentrations of hGHRL or hGHRL1-18 (0.1
19 nM) are sufficient to induce differentiation in i28 cells (Figure 3 A and B), but a lower
20 concentration has no effect (0.01 nM). This differential sensitivity to ghrelin may be due
21 to differences between the cells lines used, C2C12 or i28 cells, and/or to their larger
22 number of passages than a primary culture.

23 ***Myogenin expression in bovine myoblasts***

1 The concentrations of hGHRL and hGHRL1-18 required to induce an increase in
2 myogenin expression were similar (Figure 5 A and B). The difference between the
3 concentrations of hGHRL required to induce a significant increase in myogenin protein
4 (100 nM, Figure 5A) and mRNA expression (10 nM, Figure 5B) may be due to different
5 regulatory mechanisms, differences in measurement technique, or both. One of the
6 systems to stabilize the mRNA is the binding protein HuR (Figuerola et al., 2003), and
7 association of myogenin mRNA with HuR. It is known that myogenin protein synthesis
8 is induced by MyoD, and MRF4 is a myogenin inhibitory modulator (Thayer et al.,
9 1989); thus, it might be relevant to measure the expression of these myogenin regulators
10 in further studies.

11 It is important to note that the percentage induction of myogenin in bovine myoblasts
12 cultured in DM is larger than in i28 cells, 13.13 vs 4.96, respectively (Figure 3 A and
13 Figure 5 A). This result suggests that in bovine myoblasts, myogenin expression is
14 induced before or immediately after contact with DM, and therefore, the treatments had
15 little or no effect on its expression. In contrast, this does not seem to be the case for i28
16 mouse cells.

17 The fusion of bovine myoblasts resulting in myotubes (Figure 6) is equivalent to the
18 expression of actin and myosin heavy chains in C2C12 cells at the end of the process of
19 muscle differentiation, shown by Ferri et al. (2009) using immunocytochemistry.

20 Several factors may contribute to the differences in the responses to ghrelin between the
21 two models studied here: myoblasts were derived from different species (mouse and
22 bovine), doubling time in culture varies between the i28 cells (12-24 h) and the primary
23 myoblast cultures (24-36 h), gene mutations are likely to have taken place in cell lines
24 (Alberts et al., 2004), and cells may grow in monolayer or in multilayers, increasing
25 differentiation by increasing the junctions between cells (Rosen et al., 1993). Moreover,

1 it is important to determine whether the effect of hGHRL on i28 cells may be mediated
2 by one or more types of receptors. It has been proposed that ghrelin in skeletal muscle
3 activates a member of the GHS receptor family (GHSR1a). Real-time PCR analyses
4 showed that GHSR1b and GHSR1a mRNA are expressed in human myocardium
5 (Gnanapavan et al., 2002), but GHSR1a mRNA has not yet been detected in C2C12
6 cells (Filigheddu et al., 2007). Here, we have demonstrated the presence of GHSR1a
7 and CD36 mRNA in both the i28 cells and in bovine myoblasts, which opens the
8 possibility that ghrelin could interact with either one of them. It has been reported that
9 ghrelin may stimulate the CD36 receptor (Avallone et al., 2006). Human full-length
10 ghrelin and fragment 1-18 have sequences with high similarity (90%) to synthetic
11 mouse ghrelin and differ from bovine ghrelin, which lacks glutamine 13; this difference
12 could explain the lower union of the human peptides to the bovine myoblast receptors.

13 In summary, we established that 0.1 to 100 nM hGHRL and hGHRL1-18 stimulate
14 myogenic differentiation in the i28 satellite cells. On the other hand, differentiation in
15 bovine myoblasts was effective at doses of 10 and 100 nM hGHRL. Hence the muscle
16 differentiation shown here after ghrelin stimulation can potentially be used in beef
17 animals, as a way to promote better quality carcasses.

18 **Acknowledgments**

19 This work was part of the master in science thesis that the senior author submitted to the
20 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Denisse Montoya also thanks
21 CONACYT for a scholarship at Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM,
22 México. We thank Dorothy Pless for revising the English manuscript.

23

LITERATURE CITED

- 1 Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & J. D. Watson. 2004. *Molecular*
2 *Biology of the Cell*.
- 3 Avallone, R., A. Demers, A. Rodrigue-Way, K. Bujold, D. Harb, S. Anghel, W. Wahli,
4 S. Marleau, H. Ong, and A. Tremblay. 2006. A growth hormone-releasing
5 peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates
6 sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome
7 proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol. Endocrinol.* 20:
8 3165-78.
- 9 Barazzoni, R., A. Bosutti, M. Stebel, M.R. Cattin, E. Roder, L. Visintin, L. Cattin, G.
10 Biolo, M. Zanetti, and G. Guarnieri. 2005. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid
11 metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal
12 muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288: E228-35.
- 13 Barazzoni, R., X. Zhu, M. Deboer, R. Datta, M. D. Culler, M. Zanetti, G. Guarnieri, and
14 D. L. Marks. 2010. Combined effects of ghrelin and higher food intake enhance
15 skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity and AKT phosphorylation in
16 rats with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 77: 23-8.
- 17 Bulgarelli, I., L. Tamiazzo, E. Bresciani, D. Rapetti, S. Caporali, D. Lattuada, V.
18 Locatelli, and A. Torsello. 2009. Desacyl-ghrelin and synthetic GH-
19 secretagogues modulate the production of inflammatory cytokines in mouse
20 microglia cells stimulated by beta-amyloid fibrils. *J. Neurosci. Res.* 87: 2718-27.
- 21 Chen, C. Y., A. Asakawa, M. Fujimiya, S. D. Lee, and A. Inui. 2009. Ghrelin gene
22 products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol. Rev.* 61:
23 430-81.

- 1 Demers, A., V. Caron, A. Rodrigue-Way, W. Wahli, H. Ong, and A. Tremblay. 2009. A
2 concerted kinase interplay identifies PPARgamma as a molecular target of
3 ghrelin signaling in macrophages. *PLoS One*. 4: e7728.
- 4 Dodson, M.V., D. C. McFarland, E. L. Martin, and M. A. Brannon. 1986. Isolation of
5 satellite cells from ovine skeletal muscle. *J. Tiss. Cul. Meth.*; 10: 233-37.
- 6 Ferri, P., E. Barbieri, S. Burattini, M. Guescini, A. D'Emilio, L. Biagiotti, P. Del
7 Grande, P. De Luca, V. Stocchi, and E. Falcieri. 2009. Expression and
8 subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation
9 of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J. Cel. Biochem.*108: 1302-17.
- 10 Figueroa, A., A. Cuadrado, J. Fan, U. Atasoy, G.E. Muscat, P. Muñoz-Canoves, M.
11 Gorospe, and A. Muñoz. 2003. Role of HuR in skeletal myogenesis through
12 coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol. Biol. Cell*. 23: 4991-04.
- 13 Filigheddu, N., V. F. Gnocchi, M. Coscia, M. Cappelli, P. E. Porporato, R. Taulli, S.
14 Traini, G. Baldanzi, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Arnoletti, C. Ghè, A. Fubini, N.
15 Surico, F. Sinigaglia, C. Ponzetto, G. Muccioli, T. Crepaldi, and A. Graziani.
16 2007. Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12
17 skeletal muscle cells. *Mol. Biol. Cel*. 18: 986-94.
- 18 Gnanapavan, S., B. Kola, S.A. Bustin, D. G. Morris, P. McGee, P. Fairclough, S.
19 Bhattacharya, R. Carpenter, A.B. Grossman, and M. Korbonits. 2002. The tissue
20 distribution of the mRNA ofghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in
21 humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 87: 2988.
- 22 Green, A.L., D. N. Wells, and B. Oback. 2007. Cattle cloned from increasingly
23 differentiated muscle cells. *Biol. Reprod*. 77: 395-06.

1 Irintchev, A., M. Langer, M. Zweyer, R. Theisen, and A. Wernig. 1997. Functional
2 improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary
3 myoblasts. *J. Physiol.* 500: 775-85.

4 Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa. 1999.
5 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.*
6 402: 656-60.

7 Oustanina, S., G. Hause, and T. Braun. 2004. Pax7 directs postnatal renewal and
8 propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 23:
9 3430-9.

10 Rosen, K.M., B. M. Wentworth, N. Rosenthal, and L. Villa-Komaroff. 1993. Specific,
11 temporally regulated expression of the insulin-like growth factor II gene during
12 muscle cell differentiation. *Endocrinol.* 133: 474-81.

13 SAS Institute Inc 2008. SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

14 Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1997. Sacrificio
15 Humanitario de los Animales Domésticos y Silvestres. Norma Oficial Mexicana
16 NOM-033-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación. .

17 Thayer, M.J., S. J. Tapscott, R. L. Davis, W. E. Wright, A. B. Lassar, and H. Weintraub.
18 1989. Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell.*
19 58: 2418.

20 Tomczak, K.K., V. D. Marinescu, M. F. Ramoni, D. Sanoudou, F. Montanaro, M Han,
21 L. M. Kunkel, I. S. Kohane, and A. H. Beggs. 2004 Expression profiling and
22 identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB J.*
23 2004 18:403-5.

- 1 Xie, Q.F., C. X. Wu, Q. Y. Meng, and N. Li. 2004. Ghrelin and truncated ghrelin
2 variant plasmid vectors administration into skeletal muscle augments long-term
3 growth in rats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27: 155-64.
- 4 Yablonka-Reuveni, Z., K. Day, A. Vine, and G. Shefer. 2008. Defining the
5 transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J. Anim. Sci.* 86: E207-
6 16.
- 7 Zammit, P.S., T. A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni. 2006. The skeletal muscle
8 satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.*
9 54: 1177-91.
- 10 Zhang, W., L. Zhao, and M. W. Mulholland. 2007. Ghrelin stimulates myocyte
11 development. *Cell. Physiol. Biochem.* 20: 659-64
- 12
- 13

Figure 1. Myoblast cells can be identified by their expression of the paired-box (Pax) transcription factor, Pax7; their differentiation is marked by the onset of myogenin expression, with a concomitant decline in Pax7.

A-C) A myoblast culture isolated from the semi-tendinous calf muscle and immunolabeled with an antibody against Pax7 on day 0. Panel A shows the nuclei by Hoechst stain in false color red. Panel B shows Pax7-positive cells. Panel C shows the merge of the Hoechst and Pax7 markers.

D-F) Immunolabeling of a myoblast culture isolated from the semi-tendinous calf muscle with an antibody against myogenin on day 0. Panel D shows the nuclei by Hoechst stain. Panel E shows myogenin-positive cells. Panel C shows the merge of the two markers.

G) Panel A: PCR products of myogenin cDNA and housekeeping genes obtained from differentiated myoblasts are seen. Lane 1: mouse myogenin (i28 cells), lane 2: mouse GAPDH (i28 cells), lane 3: bovine myogenin, lane 4: bovine cyclophyllin (PPIA), lane 5: molecular weight ladder. GAPDH and PPIA were used as housekeeping genes for murine (i28 cells) and bovine myoblasts, respectively.

Figure 2. Representative phase contrast microscopy images and immunostaining for myogenin expression in i28 cells treated with hGHRL or hGHRL1-18. A and B show cells in differentiation medium; C, D, E, F, and G and also M, N, O, P, and Q show phase contrast images of cells treated with increasing doses of hGHRL, 0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, and 100 nM, respectively; panels H, I, J, K, and L and also R, S, T, U, and V show immunostaining for myogenin of cells treated with increasing doses of hGHRL1-18, 0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, and 100 nM, respectively.

Figure 3. Effect of hGHR and hGHR1-18 on myogenin expression in the i28 cell line.

The following doses of ghrelin or fragment 1-18 were tested: 1) 0.01, 2) 0.1, 3) 1.0, 4) 10, 5) 100 nM. Differentiation medium was used as a positive control.

Panel A shows induction of myogenin expression as a percent of the control, measured as myogenin-positive cells.

Panel B shows induction of the myogenin gene relative to the control, as measured by qPCR. Myogenin was determined and normalized to the level of GAPDH. The bars indicate the means \pm SE from 3 independent experiments. Means without a common letter differ, $P < 0.01$.

Figure 4. Representative phase contrast microscopic images and immunostaining of myogenin expression in bovine myoblasts treated with hGHRL or hGHRL1-18. A and B show cells in differentiation medium; C, D, E, F, and G and also M, N, O, P, and Q show phase contrast images of cells treated with increasing doses of hGHRL, 0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, and 100 nM, respectively; panels H, I, J, K, and L and also R, S, T, U, and V show immunostaining for myogenin of cells treated with increasing doses of hGHRL1-18, 0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, and 100 nM, respectively.

Figure 5. Effect of hGHR and hGHR1-18 on myogenin expression in bovine myoblasts.

The following doses of ghrelin or fragment 1-18 were tested: 1) 0.01, 2) 0.1, 3) 1.0, 4) 10, 5) 100 nM. Differentiation medium was used as a positive control.

Panel A shows the percentage of myogenin protein induction over control (C, hatched bars), measured as myogenin-positive cells.

Panel B shows expression of the myogenin gene, measured by qPCR and reported relative to the control (C, hatched bars) after normalizing to PPIA expression. The bars indicate the means \pm SE from cells from 5 animals, tested in independent experiments (n = 5 animals). Means without a common letter differ, $P < 0.01$.

Figure 6. Representative images of differentiated myotubes. Actin labeled in primary cultures of satellite cells from bovine muscle after 7 days in differentiation media. Panel A, panoramic view of the myotubes formation, identified by the date tips, B-E; B, increased myotubes are observed, nuclei stained with Hoechst; C, myogenin-positive nuclei; and D, phalloidin staining showing polymerized actin fibers; E, overlap of C and D, which depicts the colocalization of the nuclei with myogenin.

Figure 7. PCR of the GHRL receptors, GHSR1a and CD36, in the mouse i28 cell line and in bovine myoblasts, compared with brain from both species.

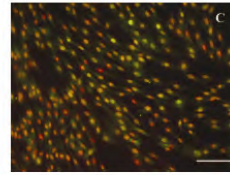
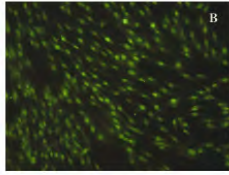
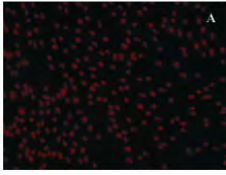
Panel A shows a 1 % agarose gel in which GHSR1a cDNA obtained from differentiated myoblasts and brain is seen. Lane 1: molecular weight ladder (100 bp), lane 2: murine GHSR1a brain, lane 3: murine GHSR1a i28 cells, lane 4: bovine GHSR1a brain, lane 5: bovine GHSR1a myoblast.

Panel B shows a 1 % agarose gel in which CD36 cDNA obtained from differentiated myoblasts and brain is seen. Lane 1: molecular weight ladder (100 bp), lane 2: murine CD36 brain, lane 3: murine CD36 i28 cells, lane 4: bovine CD36 brain, lane 5: bovine CD36 myoblast.

Panel C shows the induction of GHSR1a in brain compared with the i28 cell line or bovine myoblast.

Panel D shows the induction of CD36 in brain compared with the i28 cell line or bovine myoblast.

Pax 7



Myogenin

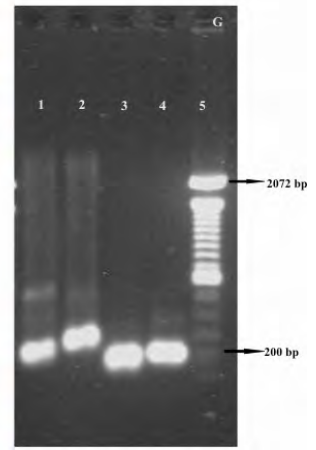
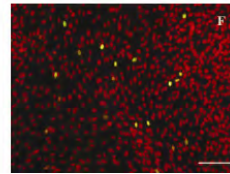
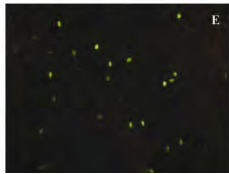
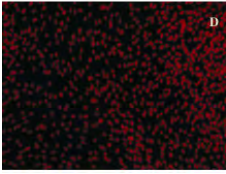
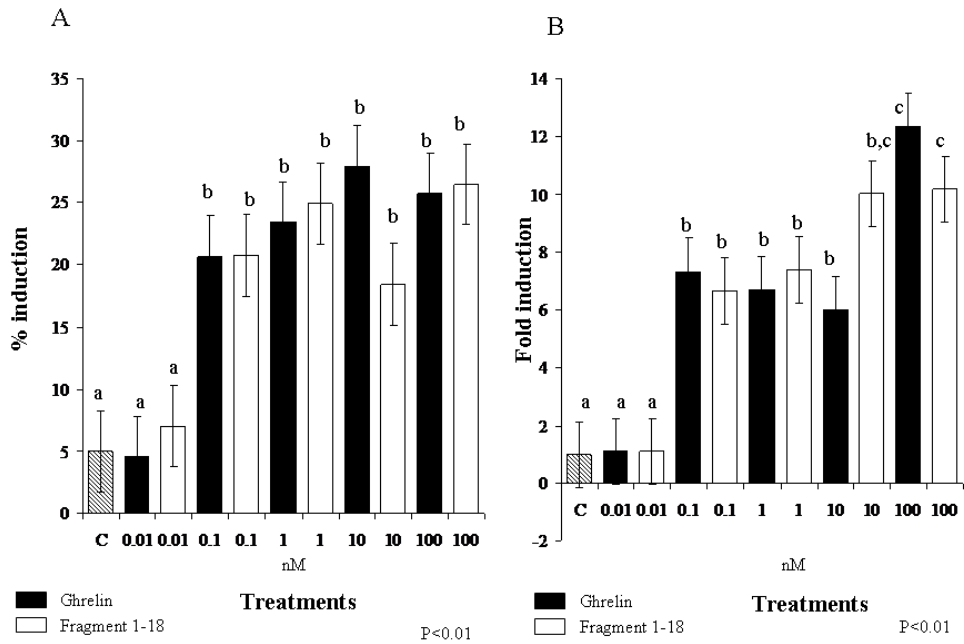


Figure 3.



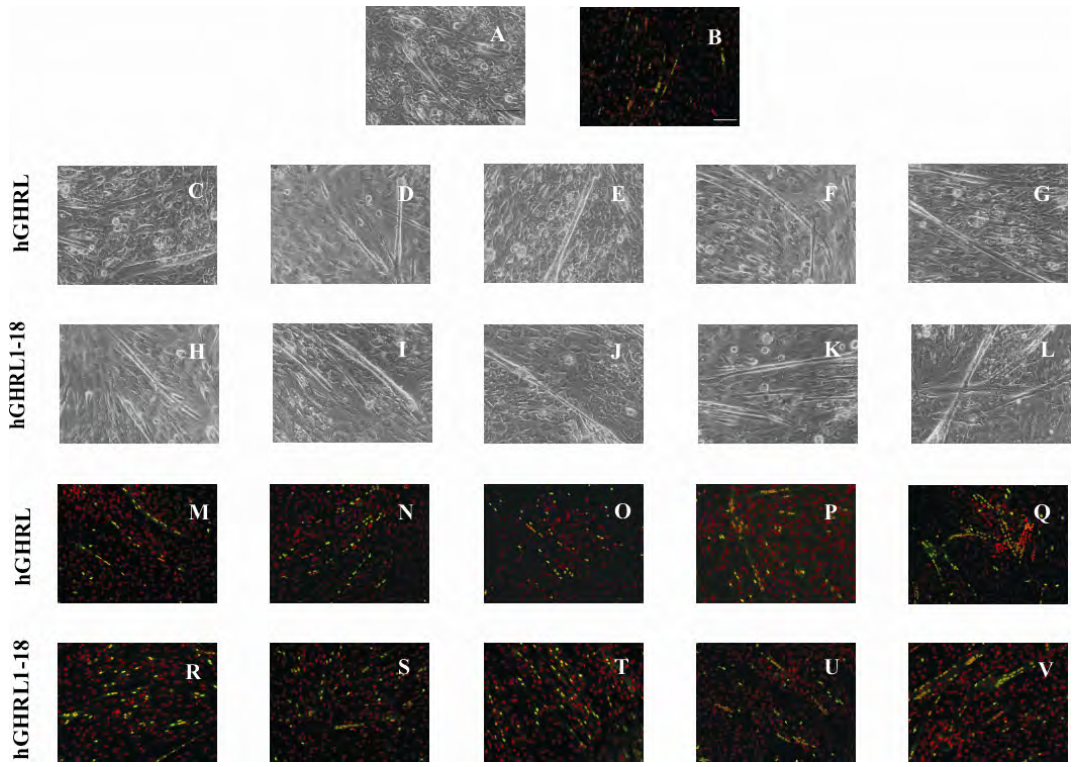
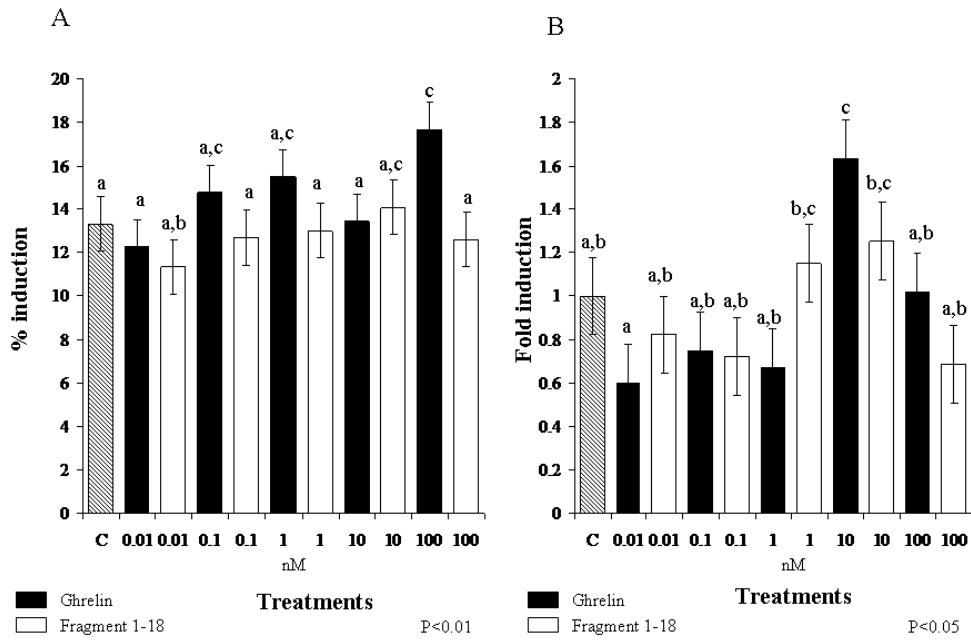


Figure 5.



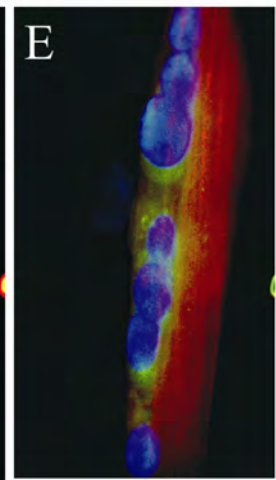
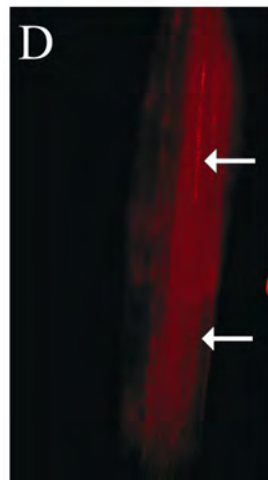
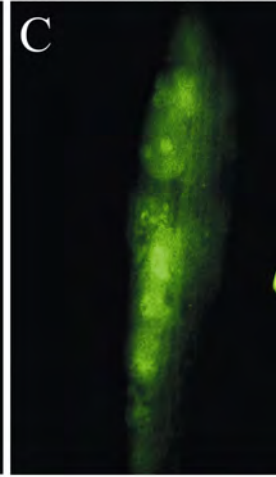
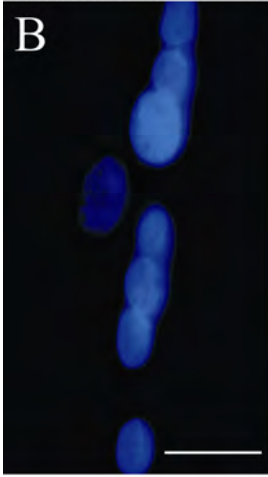
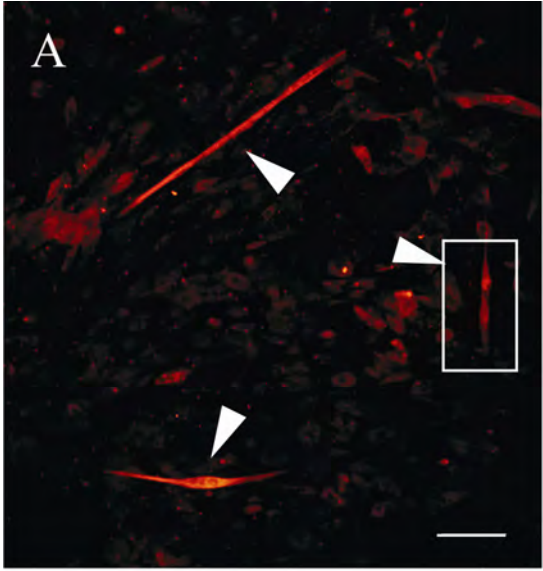
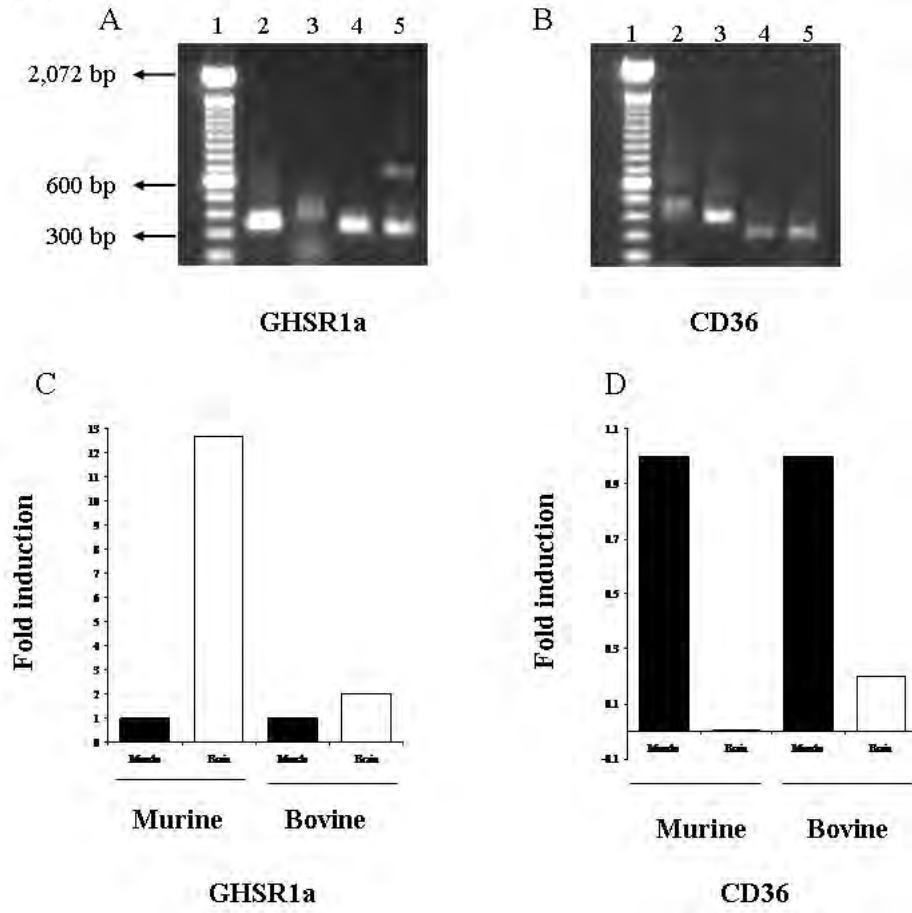


Figure 7.



6 DISCUSIÓN

6.1 Efecto de hGHRL y hGHRL1-18 sobre la diferenciación muscular en la línea celular i28

Se observó que las concentraciones de 0.1 a 100 nM tanto de hGHRL como de hGHRL1-18, tuvieron el mismo efecto respecto al aumento de la expresión de miogenina, durante el proceso de diferenciación muscular en la línea celular i28 ($P < 0.01$).

Filigheddu *et al.* (2007), reportaron que una dosis de 10nM de GHRL exógena en mioblastos de ratón C2C12 por 3 días, induce un mayor índice de diferenciación (3.5 veces más con respecto al control) y fusión (25 veces más con respecto al control). Por otro lado, Zhang *et al.* (2007) encontraron que una dosis de 100nM de GHRL exógena en mioblastos C2C12 aumenta significativamente la expresión de MyoD y el índice de miogénesis, a diferencia de su control en medio de diferenciación. Estos resultados difieren de lo encontrado en este estudio en cuanto a la dosis con la cual se induce expresión de miogenina, ya que a partir de 0.1 nM de hGHRL y hGHRL1-18 se observó efecto en la línea celular i28. Tal vez la causa de estos resultados es que cada tipo de línea celular posee características diferentes, también podría influir el tipo de suero que se haya utilizado para inducir diferenciación (suero equino vs. suero fetal bovino) o las matrices utilizadas para la adhesión de las células (Dodson *et al.*, 1990, Burton *et al.*, 2000).

Los resultados encontrados en éste trabajo y en la literatura (Filigheddu *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007) coinciden en que la ghrelina acilada y su fragmento 1-18 activan el programa completo de diferenciación en mioblastos esqueléticos de las líneas celulares C2C12 e i28, ambas de ratón.

Es importante señalar que el número de pasajes podría afectar los resultados, se sabe que a mayor número de pasajes hay una menor respuesta y viceversa. Las células usadas en este estudio tenían pocos pasajes, por lo que se asocia con una buena respuesta. También se debe tener en cuenta que en el presente estudio se administraron las dosis de hGHRL y hGHRL1-18 al observar una confluencia del 80%, a diferencia de los otros estudios, en los cuales parten confluencias mayores

al 80%, lo cual pudo mostrar resultados con un menor tiempo de diferenciación en los cultivos con C2C12.

6.2 Efecto de hGHRL y hGHRL1-18 sobre la diferenciación muscular en mioblastos de bovino

Se encontró que la proteína miogenina, en el análisis de inmunocitoquímica incrementó significativamente con la dosis 100 nM de hGHRL ($P < 0.01$). Por otro lado, los niveles de expresión obtenidos para RNA mensajero de miogenina, mediante la técnica de qPCR, se observó una inducción significativa por la administración de hGHRL a una concentración de 10 nM ($P < 0.05$). En contraste, las dosis aplicadas de hGHRL1-18 no tuvieron efecto sobre la expresión de miogenina en mioblastos bovinos. En los experimentos realizados con hGHRL1-18 en las concentraciones de 10 y 100 nM no aumento miogenina en los mioblastos bovinos, probablemente porque es necesaria la secuencia completa de hGHRL.

Respecto a las diferencias encontradas en la dosis de respuesta necesaria para inducir la expresión de la proteína o de su mensajero, podría suponerse que éstas son debidas a la interacción de las concentraciones de hGHRL o hGHRL1-18 con los diferentes mecanismos de regulación de cada uno de ellos, como la presencia de moduladores positivos (MyoD) o inhibitorios (MRF4) de la proteína, o bien al mantenimiento de la vida media del RNA mensajero (Thayer *et al.*, 1989; Figueroa *et al.*, 2003).

6.3 Comparación entre los mioblastos de bovino e i28

La diferencia en la respuesta observada entre los dos tipos celulares estudiados probablemente se deba a diversos factores, entre ellos que los mioblastos derivan de especies diferentes (ratón y bovino), que las características de crecimiento en cultivo para cada tipo celular varía entre una línea celular (12 a 24 horas) y un cultivo primario (24 a 36 horas) y en el tiempo requerido para la división celular debido a mutaciones en los genes responsables en el caso de la línea (Alberts *et al.*, 2004).

Otra posible causa es el tipo de crecimiento en cultivo que muestra un cultivo primario y una línea celular, esto es en mono capa y en varias capas de células respectivamente, en el último caso al mantenerse en capas se favorece la

confluencia entre las células y por lo tanto aumenta la diferenciación (Rosen *et al.*, 1993).

De igual forma se debe considerar la posibilidad de que existan diferencias en el número y tipo de receptores en cada tipo celular, así como el hecho de que se usó GHRL humana, que es idéntica a la de ratón; sin embargo, la hormona de bovino carece de la glutamina localizada en la posición 13, lo cual pudo haber provocado una diferencia en la especificidad de GHRL humana para unirse al receptor en los mioblastos de bovino.

En ambos tipos celulares se observa que para la concentración 100 nM de ambos compuestos, ya no existe aumento del RNA mensajero de miogenina, lo que pudiera deberse a la saturación de su receptor.

6.4 Receptores de hGHR y hGHR1-18

Resulta interesante saber por cual vía de señalización tuvo efecto hGHRL y hGHRL1-18 en los tipos celulares aquí estudiados. Esto es, a qué receptor se unen preferencialmente hGHRL y hGHRL1-18 en los mioblastos.

Se sabe que hGHRL se puede unir a GHSR1a por otro lado, aún no es claro si podría unirse a CD36, y que ésta unión varía en cada tejido. En la línea celular C2C12 no se identificó la presencia del RNA mensajero de GHSR1a (Filigheddu *et al.*, 2007). En los cardiomiocitos se ha reportado la presencia de los receptores GHSR1a, GHSR1b, GHSRu y CD36; sin embargo, el análisis por PCR en tiempo real muestra que en miocardio humano se expresan RNA mensajero de GHSR1a y GHSR1b. (Gnanapavan *et al.*, 2002). Trabajos realizados en este laboratorio demostraron la presencia del RNA mensajero GHSR1a y CD36 por PCR convencional tanto en la línea i28 como en los mioblastos bovinos, lo cual abre la posibilidad de que GHRL en el músculo podría interactuar con uno o con ambos receptores (datos sin publicar).

Para comparar la expresión en un tejido que se sabe tiene una alta expresión de GHRL, se tomaron muestra de hipófisis de ratón y de cerebro medio de bovino y se efectuó la extracción del RNA total de dichos órganos y con ellos se realizó un PCR convencional para comparar los resultados obtenidos en células musculares (en medio de diferenciación sin tratamiento). En todos los casos se comprobó la

presencia de GHSR1a y CD36 mediante la secuenciación de los productos de PCR. También se realizó qPCR de los DNA complementarios obtenidos, se encontró que GHSR1a se expresa mayormente en cerebro y CD36 más en músculo, como era de esperarse (Gnanapavan *et al.* 2002; Hirano *et al.* 2003).

Además se realizó qPCR para cuantificar los receptores, GHSR1a y CD36, de los mioblastos bovinos tratados con todas las concentraciones de hGHRL y hGHRL1-18 comparándola con el medio de diferenciación sin tratamiento. No se observaron diferencias entre tratamientos en ninguno de los receptores ($P > 0.05$).

Será necesario realizar más experimentos en este sentido porque algunos reportes muestran que el mecanismo de acción de GHRL vía CD36 es estimulando la expresión de PPAR's (Avallone *et al.*, 2006), lo que implicaría un aumento en la oxidación de los ácidos grasos y por lo tanto en la eficiencia energética en éstas células, sin dejar de considerar el efecto de GHRL vía GHSR1a que implica la diferenciación celular.

7 CONCLUSIONES

La hGHRL y hGHRL1-18 provocaron un aumento (entre 4 y 5 veces más comparados con el MD) en la diferenciación celular de mioblastos de la línea i28, en dosis que van de 0.1 a 100 nM. El efecto de ambos compuesto fue el mismo, tanto para la expresión de la proteína como de su RNA mensajero.

La hGHRL provocó un aumento en la diferenciación celular de mioblastos bovinos en las dosis de 10 y 100 nM; se requirió una dosis mayor (100 nM) para incrementar la expresión de la proteína (0.4 veces más comparado con el MD); mientras que con una concentración de 10 nM, se incrementó la expresión de su RNA mensajero (0.5 veces más comparado con el MD). La hGHRL1-18 no tuvo ningún efecto en éste tipo celular.

Mediante la técnica de qPCR se comprobó la presencia de dos receptores de GHRL, a saber GHSR1a y CD36, tanto en la línea celular i28 como en los mioblastos bovinos.

Se concluye que la hGHRL en mioblastos bovinos *in vitro* induce la expresión de miogenina y por lo tanto diferenciación celular.

Se propone que el uso de hGHRL en bovinos productores de carne podría tener en un futuro un efecto positivo sobre la diferenciación del tejido muscular.

8 LITERATURA CITADA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. 2004. *Molecular Biology of the Cell*.
- Anderson, K.A., Ribar, T.J., Lin, F., Noeldner, P.K., Green, M.F. & Muehlbauer, M.J. 2008. Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell. Metab.* 7:377-88.
- Andrews, Z.B., Liu, Z.W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E. & Friedman, J.M. 2008. UCP2 mediates GHRelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature.* 454:846-51.
- Avallone, R., Demers, A., Rodrigue-Way, A., Bujold, K., Harb, D., Anghel, S., Wahli, W., Marleau, S., Ong, H. & Tremblay, A. 2006. A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and GHRelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol. Endocrinol.* 20(12):3165-78.
- Beaumont, N.J., Skinner, V.O. & Tan, T.M. 2003. GHRelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J. Biol. Chem.* 278:8877-80.
- Bednarek, M.A., Feighner, S.D., Pong, S.S., McKee, K.K., Hreniuk, D.L., Silva, M.V., Warren, V.A., Howard, A.D., Van der Ploeg, L.H. & Heck, J.V. 2000. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, GHRelin: minimal sequence of GHRelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor1a. *Journal of Medicinal Chemistry.* 43:4370-4376.
- Bodart, V., Febbraio, M., Demers, A., McNicoll, N., Pohankova, P., Perreault, A., Sejlitz, T., Escher, E., Silverstein, R.L., Lamontagne, D. & Ong, H. 2002. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ. Res.* 90: 844-849.

- Burton, N.M., Vierck, J.L., Krabbenhoft, L., Byrne, K., Dodson, M.V. 2000. Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions. *Methods in Cell Science* 22:51-61.
- Carlson, B.M.2005. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 3ra Edición. Ed. Elsevier. España. Pp. 196-200.
- Castañeda, T.R., Tong, J., Datta R., Culler M. & Tschöp, M.H. 2010. GHRelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31:44-60.
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., McGregor, J.L. 2007. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 75:468-477
- Consejo Nacional de Población. *Proyecciones de la Población de México 2005-2050*. Consulta en Internet el 19 de Abril de 2010: www.conapo.gob.mx.
- Cossu, G. & Borello, U. 1999. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *Embriology* 18:6867-6872.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., & Weigle, D.S.2001. A preprandial rise in plasma GHRelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 50:1714-1719.
- Chargé, S.B.P. & Rudnicki, M. A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84:209-238.
- Chu, K.M., Chow, K.B., Leung, P.K., Lau, P.N., Chan, C.B., Cheng, C.H. & Wise, H. 2007. Overexpression of the truncated GHRelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by GHRelin receptors but has no effect on GHRelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39:752-764.
- Date, T., Shimbara, S., Koda, K., Toshinai, T., Ida, N., Murakami, M., Miyazato, K., Kokame, Y., Ishizuka, Y., Ishida, H., Kageyama, S., Shioda, K., Kangawa, K. & Nakazato, M. 2006. Peripheral GHRelin transmits orexigenic signals

through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus, *Cell Metab.* 4:323-331.

Date, Y, Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, MS., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M. 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 11:4255-4261.

Dodson, M.V., Mathison, B.A., Mathison, B.D. 1990. Effects of medium and substratum on ovine satellite cell attachment, proliferation and differentiation in vitro. *Cell Differentiation and Development.* 29:59-66.

Ensembl (European Molecular Biology Laboratory) consultado el 14 de Junio de 2010 en Internet: <http://www.ensembl.org/>

Ewton, D.Z., Falen, S. L. & Florini J.R. 1987. The Type II Insulin-like Growth Factor (IGF) receptor has low affinity for IGF-I analogs: Pleiotypic actions of IGFs on myoblasts are apparently mediated by the type I receptor. *Endocrinology.* 120:115-123.

Figueroa, A., Cuadrado, A., Fan, J., Atasoy, U., Muscat, G.E., Muñoz-Canoves, P., Gorospe, M. & Muñoz, A. 2003. Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol. Cell Biol.* 23:4991-5004.

Filigheddu, N.V., Gnocchi, F., Coscia, M., Cappelli, M., Porporato, E.P., Taulli, R., Traini, S., Baldanzi, G., Chianale, F., Cutrupi, S., Arnoletti, E., Ghe, C., Fubini, A., Surico, N., Sinigaglia, F., Ponzetto, F., Muccioli, G., Crepaldi, G. & Graziani, A. 2007. GHRelin and Des-Acyl GHRelin Promote Differentiation and Fusion of C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Molecular Biology of the Cell.* 18:986-994.

Financiera Rural. Monografía del Ganado bovino. 2009. Consulta en internet: 15 de Abril de 2010.

www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/.../Monografias/MONOGRAFIA%20BOVINO-octubre.pdf

- Florini, J.R., Ewton, D.Z. & Roof, S.L. 1991. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of gene expression. *Molecular endocrinology*. 5(5):718-24.
- Gilbert, S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts USA.
- Gil-Campos, C.M., Aguilera, R. & Canete, A.G. 2006. GhRelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br. J. Nutr.* 96:201-226.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B. & Korbonits, M. 2002. The tissue distribution of the mRNA of GhRelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 87:2988.
- Gutiérrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R., Luo, S., Onyia, J.E. & Hale, J.E. 2008. GhRelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:6320–5.
- Hamamori, J., Wu, H-Y., Sartorelli, V. & Kedes, L. 1997. The basic domain of myogenic basic hélix-loop-helix (Bhlh) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, twist. *Mol. Cell Biol.* 17:6563-657.
- Hayashida, T., Murakami, K., Mogi, K., Nishihara, M., Nakazato, M., Mondal, M.S., Horiie, Y., Kojima, K., Kangawa, K., Murakami, N. 2001. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domestic Animal Endocrinology* 21:17–24.
- Hirano, K.I., Kuwasako, T., Nakagawa, T.Y., Janabi, M., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. 2003. Pathophysiology of Human Genetic CD36 Deficiency. *Cardiovascular Medicine.* 13:136-141.
- Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M. & Tschop, M. 2001. Minireview: GhRelin and the regulation of energy balance--ahypothalamic perspective. *Endocrinology.* 142:4163-9.
- Hosoda, H., Kojima, M. & Kangawa, K. 2006. Biological, physiological and pharmacological Aspects of GhRelin. *J. Pharmacol Sci.* 100:398-410.

- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. 2000. GHRelin and des-acyl GHRelin: two major forms of rat GHRelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279:909-913.
- Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., & Kangawa, K. 2003. Structural divergence of human GHRelin. Identification of multiple GHRelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J. Biol. Chem.* 278:64-70.
- Kishimoto, M., Okimura, Y., Nakata, H., Kudo, T., Iguchi, G., Takahashi, Y., Kaji, H., & Chihara, K. 2003. Cloning and characterization of the 5'(-)-flanking region of the human GHRelin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:186-192.
- Kanamoto, N., Akamizu, T., Tagami, T., Hataya, Y., Moriyama, K., Takaya, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., & Nakao, K. 2004. Genomic structure and characterisation of the 5'-flanking region of the human GHRelin gene. *Endocrinology* 145:4144-4153.
- Kim, M.S. Ya, Y.G., Geum, J.P., Joo, P.Y., Soo, S.C., Sun, P.H., Won, R.J., Kim, P.K., Yeol, P.J., Up, L.K., Yeon, K.S., Kyu, L.H., Bum, K.Y. & Soo, P.K. 2004. The mitogenic and antiapoptotic actions of GHRelin in 3t3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* 18:2291-2301.
- Knoepfler, P.S. (1999) A conserved motif N-terminal to the DNA binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with pbx-Meis1/Prep1. *Nucleic Acids Res.* 27:3752-3761
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. 1999. GHRelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 402:656-60.
- Kojima, M., Hosoda, H. & Kangawa, K. 2001. Purification and distribution of GHRelin: The natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 56:93-97.
- Kojima, M. & Kangawa, K. 2005. GHRelin: Structure and function. *Physiol Rev.* 85:495-522.

- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A. & Mitchell, S.E. 2005. Cannabinoids and Ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280:25196-201.
- Korbonits, M., Goldstone, A. P., Gueorguiev, M., & Grossman, A. B. 2004. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front. Neuroendocrinol.* 25:27-68.
- Kukol, A. 2008. The structure of ghrelin. *Vitam Horm.* 77:1-12.
- Larsen, W.J. 2003. *Embriología humana*. 3ra. Edición. Ed. Elsevier. España.
- Leite-Moreira, A. F., & Soares, J-B. 2007. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of Ghrelin. *Drug Discovery Today.* 12:(7-8): 276-288.
- Li, J., Mayner, & Wu, C. 1999. A Novel Muscle-Specific (1-Integrin Binding Protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* 147(7):1391-1398.
- Lluís, F., Perdiguero, E., Nebreda, A.R., Muñoz, C.P. 2006. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Cell Biology.* 16:36-44.
- López, M., Lage, R., Saha, A.K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J. & Varela, L. 2008. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of Ghrelin. *Cell Metab.* 7:389-99.
- Ludolph, D.C. & Konieczny, S. F. 1995. Transcription factors families: myosin in on the myogenic program. *FASEB J.* 9:1595-1604.
- Megeney, A.L. & Rudnicki, M.A. 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell Biol.* 73:723-732.
- Muccioli, G., Baragli, A., Granata, R., Papotti, M. & Ghigo, E. 2007. Heterogeneity of Ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel Ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology.* 86(3):147-64.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y. 2001. A role of Ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 409:194-198.

- Naya, F.J. & Olson, E. 1999. MEF2: a Transcriptional Target for Signaling Pathways controlling Skeletal Muscle Growth and Differentiation. *Cell. Biol.* 11:683-688.
- Pemberton, C.J. & Richards, A.M. 2008. Biochemistry of GhRelin precursor. *Peptides Vitamins and Hormones.* 77:13-30.
- Puri, P.L. & Sartorelli, V. 2000. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J. Cell. Physiol.* 185:155–173.
- Riediger, T., Traebert, M., Schmid, H.A., Scheel, C., Lutz, T.A. & Scharrer, E. 2003. Site specific effects of GhRelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuro. Sci. Lett.* 341:151-5.
- Rindi, G., Torsello, A., Locatelli, V., Solcia, E. 2004. Ghrelin Expression and Actions: A Novel Peptide for an Old Cell Type of the Diffuse Endocrine System. *Experimental Biology and Medicine* 1:1007-1016.
- Rosen, K.M., Wentworth, B.M., Rosenthal, N. & Villa-Komaroff, L. 1993. Specific, temporally regulated expression of the insulin-like growth factor II gene during muscle cell differentiation. *Endocrinology.* 133(2):474-81.
- Salfen, B.E., Carroll, J.A., Keisler, D.H. & Strauch, T.A. 2004. Effects of exogenous GhRelin on feed intake, weight gain, behavior, and endocrine responses in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82:1957-1966.
- SAGARPA. 2009. Escenario Base 2009-2018 Proyecciones para el Sector Agropecuario de México. Consulta en internet: 10 de abril de 2010. www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/.../EBespañol300909.pdf.
- Scott, G.F. 2005. *Biología del desarrollo*. 7ma. edición Ed. Médica panamericana. España. Pp. 504-506.
- Seale, P. & Rudnicki, M.A. 2000. A new look at the origin, function, and stem-cell status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 218:115-124.
- Shanado, Y., Kometani, M., Uchiyama, H., Koizumi, S. & Teno, N. 2004. Lysophospholipase I identified as a GhRelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325:1487-94.

- Silva, E.M.V., Bednarek, M.A. & Gao, Y.D. 2001. ¹H NMR structural analysis of human GHRelin and its six truncated analogs. *Biopolymers*. 59:489-501.
- Smith, R.G., Feighner, S., Prendergast, K., Guan, X., & Howard, A. 1999. A new orphan receptor involved in pulsatile growth hormone release. *Trends Endocrinol Metab*. 10:128-135.
- Sorisky, A. 1999. From preadipocyte to adipocyte: differentiation-directed signals of insulin from the cell surface to the nucleus. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 36:1–34.
- Takahashi, K., Furukawa, C., Takano, A., Ishikawa, N., Kato, T., Hayama, S., Suzuki, C., Yasui, W., Inai, K., Sone, S., Ito, T., Nishimura, H., Tsuchiya, E., Nakamura, Y. & Daigo, Y. 2006. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res*. 66:9408-9419.
- Thayer, M.J., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Wright, W.E., Lassar, A.B. & Weintraub, H. 1989. Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell*. 58(2):241-8.
- Tschop, M., Smiley, D.L. & Heiman, M.L. 2000. GHRelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 407:908-13.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E. & Heiman, M.L. 2001. Circulating GHRelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707-709.
- Tollefsen, S.E., Lajara, R., McCusker, R. H., Clemmons D., R. & Rotwein, P. 1989. Insulin-like growth factors (IGF) in muscle development. Expression of IGF-I, the IGF-I receptor, and an IGF binding protein during myoblast differentiation. *J. Biol. Chem*. 264(23):13810-7.
- van der Lely, V.D., Tschop, M., Heiman, M. L., & Ghigo, E. 2004. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of GHRelin. *Endocr. Rev*. 25:426-457.

- Walsh, K. & Periman, H. 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 7(5):597-602.
- Wertz-Lutz, A.E., Knight, T.J., Pritchard, R.H., Daniel, J.A., Clapper, J.A., Smart, A.J., Trenkle, A. & Beitz, D.C. 2006. Circulating GHRelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *J. Anim. Sci.* 84:3285-3300.
- Wren, M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillo, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.S., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. 2001. GHRelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H. & Sundler, F. 2002. The GHRelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul. Pept.* 107:63-9.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockers, J., Jessell, T., Lawrence, P and Meyerowitz, E. 1998. *Principles of Development*. Oxford Press University. N.Y. USA.
- Yablonka-Reuveni, Z., Day, K., Vine, A. & Shefer, G. 2007. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J. Animal Sci.* 86(14):E207-16.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N. V. & Goldstein, J.L. 2008 Identification of the Acyltransferase that Octanoylates GHRelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 132:387-396
- Zammit, P.S., Partridge, T.A., Yablonka-Reuveni, Z. 2006. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 54(11):1177-1191.
- Zhang, W., Zhao, L., Lin, T.L., Chai, B., Fan, Y., Gantz, I. & Mulholland, M.W. 2004. Inhibition of adipogenesis by GHRelin. *Molecular Biology of the Cell*. 15:2484-2491.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C. W., Rauch, R., Klein, C. 2005. Obestatin, a peptide encoded by the GHRelin gene, opposes GHRelin's effects on food intake. *Science*. 310:996-999.

Zhang, W., Zhao, L. & Mulholland, M.W. 2007. GHRelin stimulates myocyte development. *Cell Physiol Biochem*. 20:659-664.