

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**“Estudio del efecto de la Epicatequina sobre la biogénesis de miofibras  
oxidativas y glicolíticas del músculo esquelético de ratón”**

Tesis que presenta:

Ing. en Biotecnología Claudia Negrón Lomas

Para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de tesis:

**Dr. José Manuel Hernández Hernández**

Agosto 2021.

## Resumen

El músculo esquelético (SkM) se compone de fibras musculares heterogéneas con respecto al tamaño, el metabolismo y la función contráctil. Esta diversidad permite que diferentes grupos musculares proporcionen una variedad de propiedades funcionales. Algunas enfermedades de desgaste muscular o que están relacionadas al SkM como la Distrofia muscular de Duchenne (DMD), la sarcopenia, la diabetes tipo 2 y la obesidad afectan preferentemente a ciertos tipos de fibras musculares. Se ha planteado que este tipo de condiciones podrían tratarse cambiando las características del tipo de fibra de fenotipos rápidos glicolíticos a lentos oxidativos o viceversa dependiendo de la enfermedad. Se ha demostrado que la Epicatequina (EC), un antioxidante polifenólico, tiene numerosos beneficios en el músculo esquelético similares a los que proporciona el realizar ejercicio físico. Por esta razón, se ha propuesto que este compuesto pudiera servir como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades relacionadas al músculo esquelético. Sin embargo, todavía se desconocen en gran medida cuáles son los mecanismos que regulan estos efectos. Tampoco se sabe si este compuesto puede modificar significativamente el fenotipo metabólico de los diferentes tipos de fibras musculares o si tiene la capacidad de modificar la expresión de genes específicos de miosinas en los distintos tipos de fibras musculares. En este trabajo se trataron cultivos C2C12, una línea celular inmortalizada de mioblastos de ratón, con EC [20 $\mu$ M] o DMSO como control. El tratamiento con EC aumentó la proliferación de los cultivos de manera significativa e incrementó la formación y el tamaño de los miotubos. A nivel de marcadores, el tratamiento con EC incrementó la expresión relativa de MYOG, un factor de regulación miogénico, así como los genes específicos de miosinas MYH7 (MyHCI) y MYH4 (MyHCIIIB). Así mismo, la administración de EC [1mg/kg de peso] a ratones incrementó notoriamente la expresión relativa de MYH7 (MyHCI o tipo I) en EDL. Esto sugiere que EC favorece la expresión de fibras de contracción lenta en un músculo de contracción rápida y probablemente tiene el potencial para cambiar un metabolismo glicolítico a oxidativo.

## Abstract

The skeletal muscle (SkM) is made up of heterogeneous muscle fibers with respect to size, metabolism, and contractile function. This diversity allows different muscle groups to provide a variety of functional properties. Some diseases that are muscle wasting or related to SkM such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), sarcopenia, type 2 diabetes, and obesity preferentially affect certain types of muscle fibers. It has been suggested that these conditions could be treated by changing the characteristics of the fiber type from fast glycolytic phenotypes to slow oxidative ones or vice versa depending on the disease. Epicatechin (EC), a polyphenolic antioxidant, has been shown to have numerous skeletal muscle benefits similar to those provided by physical exercise. For this reason, it has been proposed that this compound could serve as an adjunct in the treatment of diseases related to skeletal muscle. However, the mechanisms that regulate these effects are still largely unknown. It has not been elucidated whether this compound can significantly modify the metabolic phenotype of different types of muscle fibers or if it could modify the expression of specific myosin genes in different types of muscle fibers. In this work, C2C12 cultures, an immortalized mouse myoblast cell line, were treated with EC [20  $\mu$ M] or DMSO as a control. Treatment with EC significantly increased the proliferation of the cultures and increased the formation and size of the myotubes. Also, the treatment with EC increased the relative expression of MYOG, a myogenic regulatory factor, as well as the myosin-specific genes MYH7 (MyHCI) and MYH4 (MyHCIIB). Likewise, the administration of EC [1mg / kg of body weight] to mice increased notably the expression of MYH7 (MyHCI or type I) in EDL. This suggests that EC favors the expression of slow-twitch fibers in a fast-twitch muscle and probably has the potential to change glycolytic to oxidative metabolism.

## Agradecimientos

Este proyecto de investigación fue posible gracias al financiamiento que me otorgó El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que consistió en la beca nacional de maestría.

Así mismo, agradezco al departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) de la unidad Zacatenco por facilitarme las instalaciones y equipamiento necesarios.

Doy las gracias al Dr. José Manuel Hernández por ofrecerme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, así como por su excepcional papel como mi tutor lo largo de este proceso en todos los aspectos.

Así mismo, agradezco a mis asesores el Dr. Bulmaro Cisneros Vega, el Dr. Patricio Gariglio Vidal y el Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez por su apoyo, observaciones y motivación en este proceso.

Extiendo un agradecimiento muy especial al Dr. Bulmaro Cisneros Vega y al Dr. Patricio Gariglio Vidal por permitirme hacer uso de sus equipos y laboratorios y por siempre estar dispuestos a brindarme lo que fuese necesario para el desarrollo de este proyecto.

## Contenido

Resumen.....	2
Abstract .....	3
Agradecimientos .....	4
Índice de tablas .....	6
Índice de figuras .....	7
1. Introducción .....	8
1.1 El músculo esquelético.....	8
1.2 El proceso de diferenciación miogénica.....	8
1.3 La regulación de la diferenciación miogénica .....	10
1.4 El músculo esquelético está conformado por distintos tipos de fibras musculares con características fisiológicas propias. ....	11
1.5 Existen enfermedades relacionadas con el músculo esquelético que afectan selectivamente a cierto tipo de fibras musculares.....	14
1.6 Las catequinas .....	17
1.7 La Epicatequina .....	18
1.7 La Epicatequina es la catequina que presenta el mayor número de efectos positivos en el músculo esquelético.....	22
1.8 Estudios realizados en ratones y humanos sobre los beneficios de la Epicatequina en el músculo esquelético.....	25
2. Justificación y alcance del proyecto .....	27
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivo principal .....	29
5. Objetivos particulares .....	29
6. Estrategia experimental general .....	30
7. Metodología .....	31
8. Resultados .....	39
9. Discusión .....	57
10. Perspectivas futuras.....	61
11. Conclusiones.....	62
12. Referencias.....	63
11. Anexos.....	75

## Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de los diferentes efectos de las catequinas en el músculo esquelético (modificado de Penghui Li et al., 2019).....	23
Tabla 2. Lista de primers.....	75

## Índice de figuras

Figura 1. Progresión del linaje miogénico (Schmidt et al., 2019). .....	9
Figura 2. Ilustración de los tipos de músculo en ratón (Talbot et al., 2016). .....	13
Figura 3. Características de los tipos de fibras musculares (Modificado de Talbot et al., 2016).....	14
Figura 4. Los cuatro derivados principales de las catequinas (Zheng L et al., 2008). .....	17
Figura 5. El metabolismo de la Epicatequina sucede en el tracto digestivo. (Modificado de Prakash, M et al., 2019). .....	20
Figura 6. Mecanismo propuesto de la estimulación de la biogénesis mitocondrial inducida por la Epicatequina en miotubos C2C12 (Modificado de Moreno-Ulloa et al., 2018).....	22
Figura 7. Efectos de la Epicatequina sobre el músculo esquelético (Diagrama modificado de Zihao et al., 2020).....	25
Figura 8. Ensayo de proliferación .....	32
Figura 9. Ensayo de diferenciación .....	33
Figura 10. Conteo de células/mL a partir de cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20µM]. n=4 .....	39
Figura 11. Fotos de cultivos C2C12 tratados con EC o DMSO [20 µM] a diferentes tiempos de diferenciación (0h a 96h). n=4 .....	41
Figura 12. Área de miotubos ( $\mu\text{m}^2$ ) de cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20µM]. Medición realizada con ImageJ™. n=4 .....	43
Figura 13. RNA totales a partir de cultivos tratados con Epicatequina o DMSO [20 µM] a diferentes tiempos de diferenciación.....	44
Figura 14. PCR punto final para los genes MYOG y RPS18 (control endógeno).....	45
Figura 15. Expresión relativa de MYOG en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20µM] a diferentes tiempos de diferenciación. n=2 .....	47
Figura 16. Expresión relativa de MYH7 (MyHCI) en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20µM] a diferentes tiempos de diferenciación. n=2.....	49
Figura 17. Expresión relativa de MYH4 (MyHCIIB) en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20µM] a diferentes tiempos de diferenciación. n=2.....	50
Figura 18. Expresión relativa de MYOG en Soleus de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2.....	51
Figura 19. Expresión relativa de MYOG en EDL de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2.....	52
Figura 20. Expresión relativa de MYH7 (MyHCI) en Soleus de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2.....	53
Figura 21. Cambios en la expresión relativa de MYOG en los músculos Soleus y EDL de ratones con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso].....	54
Figura 22. Expresión relativa de MYH7 (MyHCI) en EDL de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2.....	55
Figura 23. Expresión relativa de MYH4 (MyHCIIB) en EDL de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2.....	56

## 1. Introducción

### 1.1 El músculo esquelético

El músculo esquelético (SkM) adulto está compuesto por numerosas miofibrillas multinucleadas que contienen la maquinaria contráctil necesaria para funciones fundamentales del organismo como la locomoción, el soporte postural y la respiración; así como la recepción, integración y transducción de señales metabólicas provenientes de la mayoría de los tejidos del organismo. Por lo tanto, el mantenimiento homeostático de la integridad muscular es fundamental en los procesos de regeneración durante el desarrollo, así como en la respuesta al daño físico y a los cambios en el nicho celular durante la vida del organismo [1]. En la Figura 1 se pueden observar los diferentes componentes del músculo esquelético adulto.

El crecimiento y correcto funcionamiento del músculo esquelético, así como su capacidad para regenerarse ante una lesión o enfermedad, dependen de una población de células especializadas con una alta capacidad de replicación y regeneración. Aproximadamente del 2 al 7% del total de los núcleos asociados a una miofibrilla particular en el músculo esquelético adulto, corresponden a las células troncales musculares; denominadas células satélite (CS) debido a su ubicación anatómica en un nicho especializado de la fibra muscular, localizado entre el sarcolema y la matriz extracelular [1].

### 1.2 El proceso de diferenciación miogénica

Las CS son las células madre musculares adultas responsables de la regeneración muscular en respuesta a una lesión o enfermedad. En el músculo esquelético adulto, las CS se encuentran en estado quiescente, es decir, en un estado de arresto reversible del ciclo celular en la etapa G<sub>0</sub>, con rasgos característicos como bajo contenido de ARN, baja actividad metabólica, bajo volumen citoplasmático y altos contenidos de heterocromatina [2].

En la Figura 2 se puede visualizar el proceso de diferenciación miogénica que está regulado en gran medida por factores de transcripción llamados factores de regulación miogénicos o MRFs por sus siglas en inglés.

En respuesta a estímulos inducidos principalmente por el daño físico o el crecimiento, las CS se activan y reingresan al ciclo celular para, por un lado, dar lugar a las células precursoras miogénicas o mioblastos necesarios para la regeneración muscular y al mismo tiempo replicarse y restablecer el reservorio de CS [3]. Es decir, las CS tienen la capacidad de generar tanto células madre auto-renovables como células hijas progenitoras comprometidas con la diferenciación muscular, un proceso que se logra mediante la división celular asimétrica.

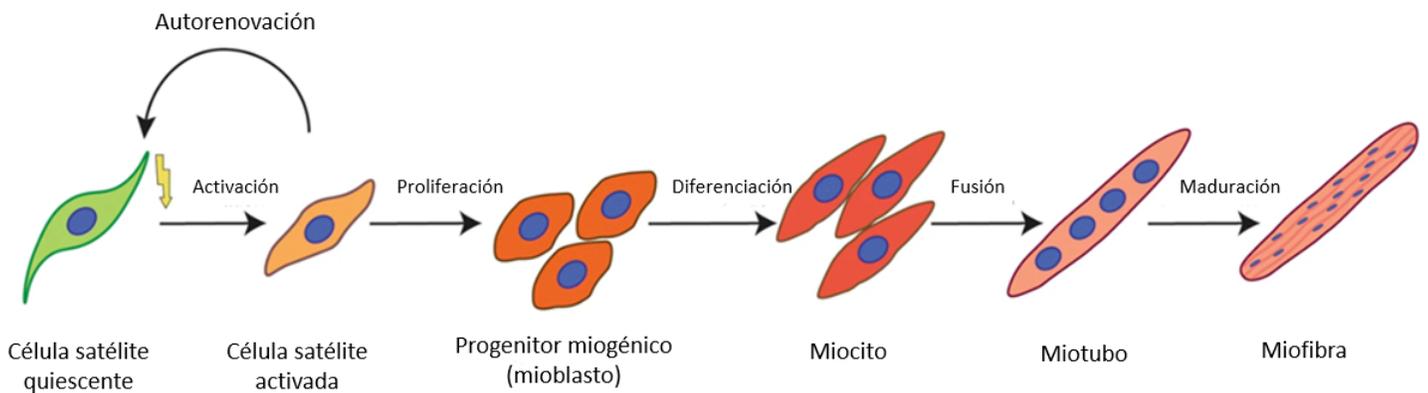


Figura 1. Progresión del linaje miogénico (Schmidt et al., 2019).

Las células musculares comprometidas, o mioblastos, son altamente proliferativas y pueden diferenciarse a miocitos los cuales se pueden fusionar para formar células multinucleadas, o miotubos, que finalmente maduran en fibras musculares. En éstas miofibras se pueden encontrar diferentes tipos de proteínas estructurales como por ejemplo actinas, tropomiosinas y miosinas. *In vitro*, los mioblastos primarios pueden proliferar en múltiples pasajes, y también pueden ser inducidos a diferenciarse en miotubos [4].

Para cumplir adecuadamente sus funciones y garantizar el mantenimiento del músculo esquelético, las CS deben mantener un equilibrio dinámico entre sus

diferentes estados celulares, es decir, quiescencia, activación, proliferación, autorenovación, compromiso y diferenciación [5, 6, 7, 8, 9].

Así mismo, el balance entre divisiones simétricas y asimétricas es indispensable en la homeostasis del músculo [10]. Los defectos en la regulación de las CS o en su nicho da como resultado la pérdida de la regeneración en condiciones degenerativas, incluido el envejecimiento. En particular, las CS envejecidas pierden su capacidad de mantener la quiescencia (a través del aumento del ciclo o la senescencia) y, una vez activadas, su destino celular se ve obligado a comprometerse con el linaje miogénico en lugar de la autorrenovación [11].

### 1.3 La regulación de la diferenciación miogénica

La diferenciación miogénica está regulada a nivel epigenético por factores de transcripción, enzimas modificadoras de histonas, variantes de histonas y factores remodeladores de cromatina. Los MRFs, son miembros de la familia de factores de transcripción que controlan la determinación y diferenciación de las células del músculo esquelético durante la embriogénesis y miogénesis postnatal. MyoD, Myf5, Myog y MRF4 son miembros de esta familia y determinan de forma jerárquica el establecimiento del linaje muscular, así como el mantenimiento del fenotipo miogénico terminal.

Los MRFs actúan en múltiples puntos en el linaje muscular para establecer cooperativamente el fenotipo del músculo esquelético. Esto sucede a través de la regulación de la proliferación y la detención irreversible del ciclo celular de las células precursoras, seguido de una activación regulada de genes sarcoméricos y estructurales del músculo para facilitar la diferenciación y el ensamblaje del aparato contráctil [12].

El factor transcripcional Pax7 es un marcador bioquímico específico de las CS. Se ha demostrado que Pax7 ES prescindible para la especificación de CS durante la embriogénesis, pero es esencial para mantener la proliferación,

supervivencia e identidad de las CS en la etapa postnatal. Este regulador transcripcional previene la diferenciación hasta que es regulado a la baja, por lo tanto, su expresión continua es esencial para mantener CS quiescentes [13], mientras que regula genes blanco involucrados en la proliferación celular [14, 15]. Uno de sus blancos directos es el MRF Myf5.

Myf5 a su vez, induce la expresión del factor MyoD en un estadio más avanzado de la miogénesis, evento que significa el compromiso celular irreversible al programa terminal de diferenciación para generar mioblastos, los cuales proliferan dando lugar a los progenitores miogénicos necesarios para la regeneración. En este estadio, la expresión del factor transcripcional Pax7 disminuye y los MRFs Miogenina y MRF4 inducen la expresión de genes de diferenciación terminal y proteínas estructurales que permitirán la funcionalidad de la miofibrilla madura [16].

#### 1.4 El músculo esquelético está conformado por distintos tipos de fibras musculares con características fisiológicas propias.

Además de sus funciones en la motilidad, el músculo esquelético desempeña un papel central en el control del metabolismo de todo el cuerpo. Estas funciones son controladas mediante vías de señalización que permiten que las fibras musculares respondan a las demandas metabólicas y funcionales del organismo [17]. La heterogeneidad del músculo esquelético humano se ilustra por la variabilidad significativa en los fenotipos bioquímicos, mecánicos y metabólicos de las fibras musculares que lo conforman. Por lo tanto, la diversidad de propiedades fisiológicas puede permitir la participación del músculo esquelético en actividades con diversas demandas metabólicas y mecánicas.

El músculo esquelético se compone de fibras musculares heterogéneas con respecto al tamaño, el metabolismo y la función contráctil [18]. Esta diversidad permite que diferentes grupos musculares proporcionen una variedad de propiedades funcionales. Las miofibras se clasifican sobre la base de la expresión

específica de isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC) en fibras tipo I, tipo IIa, tipo IIc / x y tipo IIb [19, 20].

Las fibras tipo I, también llamadas fibras de contracción lenta expresan la cadena pesada de miosina tipo 1 (MyHCI), su gen específico es el MYH7, son ricas en mitocondrias, exhiben un metabolismo oxidativo, tienen una baja velocidad de acortamiento y una alta resistencia a la fatiga. Este tipo de fibras son necesarias para movimientos que requieren resistencia, como, por ejemplo, el mantenimiento de la postura.

Por otro lado, las fibras tipo II pueden expresar las cadenas pesadas de miosina MyHCIIA, MyHCIIIX o MyHCIIIB y sus genes específicos son MYH2, MYH1 y MYH4, respectivamente. Este tipo de fibras son denominadas de contracción rápida y presentan un menor contenido mitocondrial que las de contracción lenta, así como una menor resistencia a la fatiga. Este tipo de fibras son necesarias para los movimientos que involucran fuerza y velocidad. Se ha reportado que estas fibras se pueden transformar y remodelar en respuesta a demandas fisiológicas y ambientales. Por ejemplo, se ha comprobado que el ejercicio físico puede inducir cambios en el músculo esquelético al transformar las miofibras en un metabolismo oxidativo aumentado e induce transiciones de tipo fibra de tipo IIb → tipo IIc / x → tipo IIa → tipo I [21].

La figura 2 es una representación de un corte transversal de 2 tipos de músculo localizados en la pierna del ratón; el músculo Soleus que es de contracción lenta, está enriquecido con fibras tipo 1 y fibras tipo 2A, mientras que el músculo *Extensor digitorum longus* (EDL) que es de contracción rápida que está enriquecido por fibras tipo 2A, pero también 2X y tipo 2B [22].

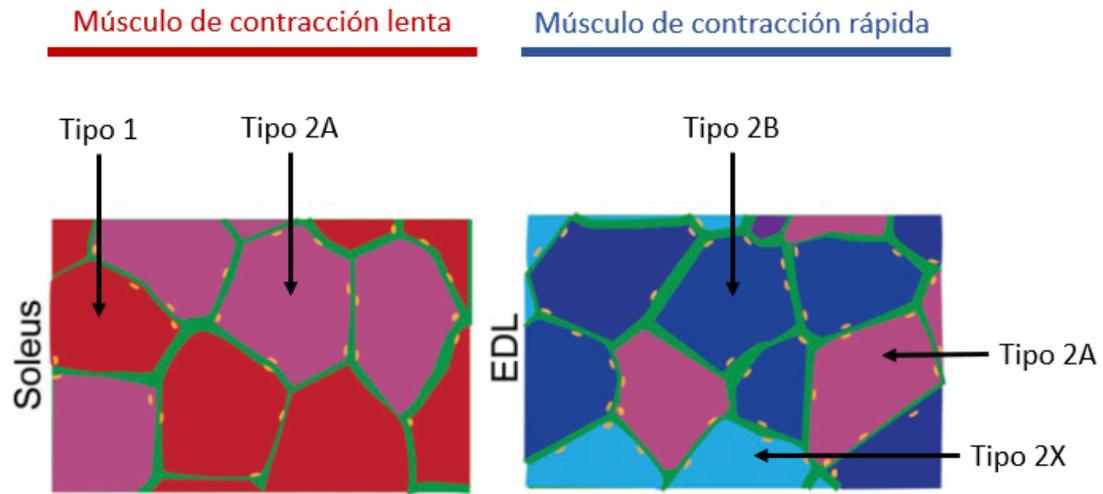


Figura 2. Ilustración de los tipos de músculo en ratón (Talbot et al., 2016).

Se ha reportado que el porcentaje de los distintos tipos de fibras presentes en el músculo de contracción lenta Soleus en ratón es: tipo I 37.42%, tipo IIA 38.62%, tipo IIAD 18.74% y tipo IID %5.69. Por otro lado, el porcentaje de fibras en el músculo de contracción rápida EDL es: tipo I 0.44%, tipo IC/IIC 3.05%, tipo IIA 0.46%, tipo IIAD 7.56%, tipo IID 0.46%, tipo IIDB 21.48% y tipo IIB 66.01% [23].

En la siguiente figura se resumen las características fisiológicas de los principales tipos de fibras musculares.

	<b>Contracción lenta (Tipo 1)</b>		<b>Contracción rápida (Tipo 2)</b>	
<b>Cadena pesada de miosina</b>	<b>MyHC1</b>	<b>MyHCIIA</b>	<b>MyHCIIIX</b>	<b>MyHCIIIB</b>
<b>Metabolismo</b>	Oxidativo	Oxidativo	Glicolítico	Glicolítico
<b>Contenido mitocondrial</b>	Alto	Menor	Menor	Menor
<b>Resistencia a la fatiga</b>	Alta	Menor	Menor	Menor
<b>Gen específico de miosina</b>	MYH7	MYH2	MYH1	MYH4
<b>Necesarias para movimientos</b>				

Figura 3. Características de los tipos de fibras musculares (Modificado de Talbot et al., 2016)

### 1.5 Existen enfermedades relacionadas con el músculo esquelético que afectan selectivamente a cierto tipo de fibras musculares

Para cumplir con las demandas físicas y el recambio de tejidos, el músculo esquelético se remodela y repara dinámicamente a lo largo de la vida [24]. Como se mencionó anteriormente, se requiere un equilibrio estrictamente regulado entre la autorrenovación y la diferenciación para apoyar el crecimiento y la regeneración del músculo esquelético [25]. Sin embargo, en enfermedades de desgaste muscular, como la distrofia muscular de Duchenne (DMD), un número reducido de divisiones asimétricas de células madre musculares conduce a una tasa reducida de generación de células progenitoras miogénicas y degeneración muscular severa [26].

En el caso de la DMD el diafragma y los músculos extensores de la extremidad proximal se afectan gravemente [27]. La razón de esto no se conoce, pero se podría suponer que las propiedades intrínsecas de los diferentes músculos pueden determinar su susceptibilidad a diversas afecciones patológicas.

Sin embargo, el conocimiento del perfil transcripcional de diferentes músculos en condiciones patológicas o posibles intervenciones para modificarlo como resultado de tratamientos farmacológicos es desconocido en gran medida.

Se ha observado que hay enfermedades relacionadas con el músculo esquelético que afectan selectivamente a cierto tipo de fibras musculares. Entre dichas enfermedades se encuentran las miopatías hereditarias, enfermedades metabólicas sistémicas y trastornos cardiovasculares comunes. Por ejemplo, en el caso de la DMD que causa una degeneración muscular severa, se ha observado que las fibras tipo 2 de contracción rápida se ven preferentemente afectadas tanto estructural como funcionalmente [28, 29].

Por otro lado, una de las alteraciones más notables y debilitantes asociadas con la edad avanzada es la pérdida progresiva de masa y fuerza del músculo esquelético, una condición conocida como sarcopenia [30]. Esta pérdida de masa muscular y fuerza junto con el aumento de grasa corporal durante el envejecimiento se producen en parte como consecuencia de cambios metabólicos asociados con un estilo de vida inactivo [31]. Se ha identificado que esta condición reduce selectivamente el tamaño de las fibras tipo 2 de contracción rápida y les confiere una mayor atrofia que a otro tipo de fibras.

En el caso de la diabetes tipo 2, la alteración de la transducción de la señal de insulina [32] y los defectos en el tráfico de GLUT4 [33] están asociados con la resistencia a la insulina del músculo esquelético en individuos con este padecimiento.

Además, se ha observado que ciertas diferencias en el tipo de fibra afectan la vía de transducción de señales de insulina; en el músculo esquelético humano, el transporte de glucosa estimulada por insulina se correlaciona directamente con el porcentaje de fibras musculares de contracción lenta, lo que sugiere que una población reducida de miofibras del músculo esquelético tipo I puede ser un

elemento importante en el desarrollo de resistencia a insulina [34]. De hecho, el músculo esquelético oxidativo de contracción lenta tiene una mayor capacidad de unión a la insulina, así como una mayor actividad de la quinasa del receptor de insulina y la autofosforilación en comparación con el músculo esquelético glucolítico de contracción rápida [35].

Las alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y el manejo inadecuado de la glucosa propician un incremento en la acumulación de ácidos grasos en las fibras musculares, una deficiente función mitocondrial y un incremento en las moléculas que inducen estrés oxidativo. Todo ello contribuye a que las CS disminuyan su capacidad de regeneración, una condición que se exagera en individuos de edad avanzada. Además, los procesos inflamatorios crónicos y otras alteraciones provocadas por enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, afectan el nicho anatómico en el que residen las CS.

Por otro lado, también se ha observado que ciertas diferencias en la composición de la fibra muscular pueden desempeñar un papel clave en la susceptibilidad de un individuo a desarrollar obesidad a causa de su dieta. De hecho, se ha reportado que el músculo esquelético en individuos obesos exhibe una capacidad oxidativa reducida, capacidad glucolítica aumentada, un porcentaje disminuido de fibras tipo I de contracción lenta y un incremento en el porcentaje de fibras tipo 2 de contracción rápida [36, 37].

Actualmente la única forma eficaz de aumentar la masa y la fuerza del músculo esquelético es realizar ejercicio físico. Sin embargo, los pacientes con enfermedades de desgaste muscular o enfermedades relacionadas al músculo esquelético no siempre pueden realizar actividad física porque su condición no se los permite. Por ello, actualmente se estudian compuestos que tengan efectos positivos en el músculo esquelético similares a los que proporciona el hacer ejercicio físico. Algunos de los compuestos más estudiados en este ámbito son las catequinas.

## 1.6 Las catequinas

Las catequinas son antioxidantes polifenólicos y el término se emplea comúnmente para referirse a la familia de los flavonoides [38]. Éstos son una clase de compuestos naturales y se pueden encontrar en alimentos como el cacao y el té verde, entre otros. Estos compuestos son reconocidos y estudiados por su potencial antioxidante y atenuación del estrés oxidativo en el músculo esquelético [39]. Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta humana, con una ingesta diaria total diez veces mayor que la de vitamina C y 100 veces mayor que la de vitamina E y carotenoides [40].

Las catequinas incluyen cuatro derivados principales: (-)-Epicatequina (EC), (-)-Epicatequina galato (ECG), (-)-epigaloaloquina (EGC) y (-)-epigaloaloquina-3-galato (EGCG). En la Figura 4 se puede observar la estructura química de estos compuestos.

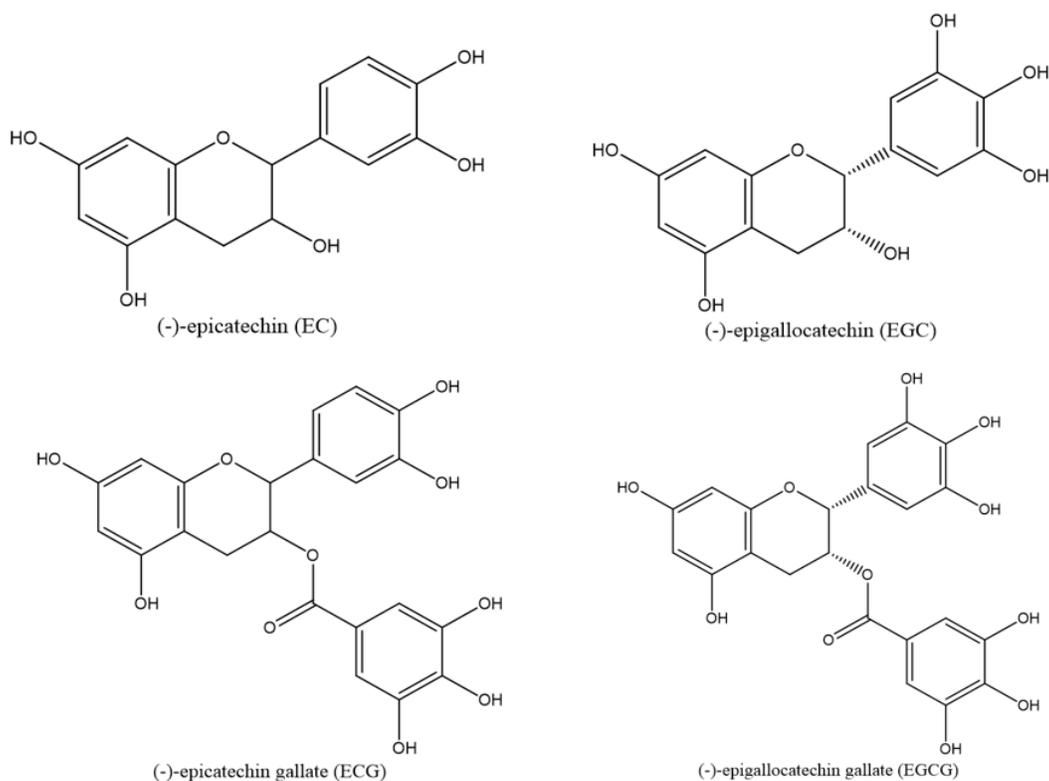


Figura 4. Los cuatro derivados principales de las catequinas (Zheng L et al., 2008).

Las catequinas contienen una gran cantidad de grupos hidroxilo fenólicos (-OH), lo que les confiere varias propiedades químicas únicas, como la unión a proteínas, a alcaloides y a polisacáridos. Se ha determinado que esto les confiere su actividad antioxidante al reducir la presencia de radicales libres [41]. También se ha determinado que estos grupos hidroxilo sirven como donantes de protones y aumentan la cantidad de ATP producido por la cadena respiratoria mitocondrial y por lo tanto acelera la recuperación de la actividad física [42].

### 1.7 La Epicatequina

La Epicatequina es un metabolito secundario prevalente en plantas y uno de los polifenoles vegetales más abundantes en la dieta humana [43]. Proviene principalmente del té y del cacao [44, 45]. La Epicatequina es reconocida por su destacada actividad antioxidante y sus metabolitos existen en el plasma y se acumulan en el cerebro, hígado, corazón, intestino, riñón y otros órganos. Este compuesto puede desempeñar un papel beneficioso en varios tejidos y órganos del cuerpo humano, en especial en el músculo esquelético [46, 47].

La Figura 5 muestra que la absorción de Epicatequina sucede en el tracto digestivo. Cuando este compuesto es liberado de la matriz alimentaria se deriva y se vuelve bioaccesible y luego es absorbida por el tracto gastrointestinal (GIT). Estas moléculas bioactivas son captadas por las células epiteliales del borde en cepillo del intestino delgado mediante el proceso de hidrólisis enzimática que libera agliconas que ingresan al enterocito.

El mecanismo que se describe a continuación corresponde al metabolismo de la Epicatequina y fue propuesto por Prakash, M et al., en el 2019 [48]. Se cree que la absorción adicional de moléculas bioactivas por el enterocito tiene lugar a través de la difusión pasiva, pero también a través de la difusión facilitada a través de transportadores ABC. Una vez en el enterocito, las agliconas pueden conjugarse mediante las enzimas de fase II, dando como resultado formas

sulfatadas, metiladas y/o glucuronizadas para formar enzimas conjugadas. Algunos de los metabolitos pueden retornar desde el enterocito al lumen intestinal por los transportadores MRP2, pero los metabolitos absorbidos que escaparon de la conjugación en el enterocito pasan a los hepatocitos a través de la vena porta hepática donde tiene lugar la conjugación adicional. Desde el hígado, los metabolitos bioactivos se excretan en la circulación sistémica y finalmente se excretan como orina o bilis. Algunas de la Epicatequina no absorbida y de las moléculas más grandes del intestino delgado llegan al intestino grueso, donde se metabolizan en moléculas más pequeñas que se excretan posteriormente en forma de heces.

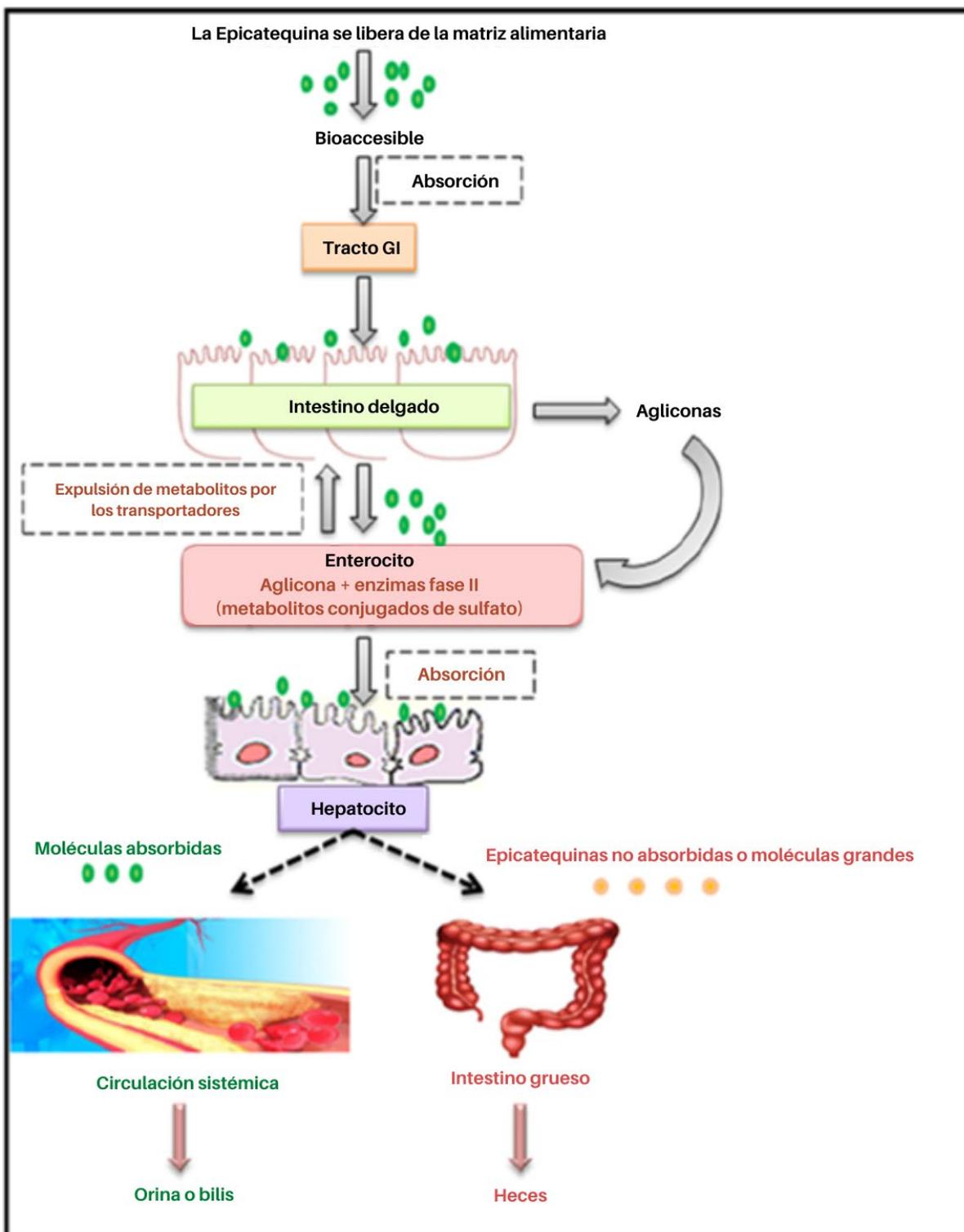


Figura 5. El metabolismo de la Epicatequina sucede en el tracto digestivo. (Modificado de Prakash, M et al., 2019).

En cuanto al receptor de la Epicatequina, el grupo de Moreno-Ulloa et al., propusieron que este compuesto estimula la biogénesis mitocondrial en células de músculo esquelético vía la activación de GPER (receptor de estrógenos acoplado a proteína G) (al menos en parte) [49].

A través del uso de mioblastos C2C12 derivados de músculo esquelético de ratón diferenciados en miotubos, así como agonistas, antagonistas y siRNAs selectivos de GPER, se evidenció la participación de este receptor en la mediación de los efectos de la Epicatequina sobre la biogénesis mitocondrial y el crecimiento de miotubos. Según la hipótesis de este grupo, la Epicatequina se une al receptor GPER y activa a NRF2, un factor nuclear de respiración celular que a su vez activa TFAM, un factor de transcripción mitocondrial y de esta forma se promueve la biogénesis mitocondrial.

La siguiente figura muestra el mecanismo propuesto de la estimulación de la biogénesis mitocondrial inducida por la Epicatequina en miotubos C2C12. G-36 se refiere al antagonista de GPER o siRNA que utilizaron en este trabajo.

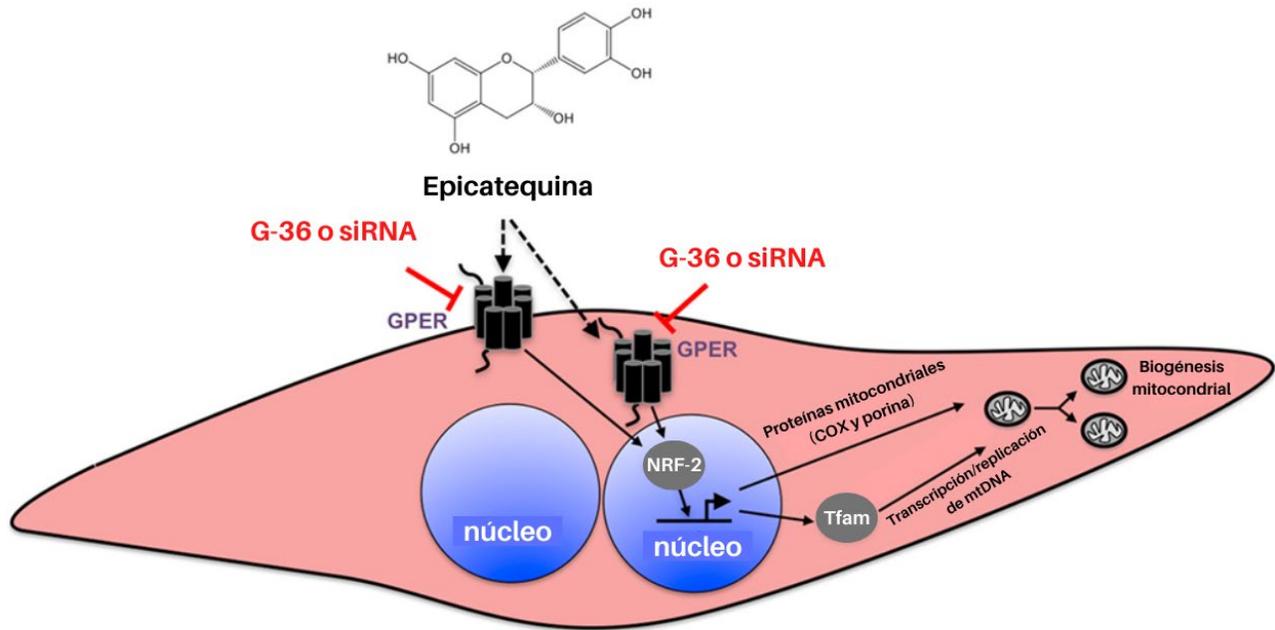


Figura 6. Mecanismo propuesto de la estimulación de la biogénesis mitocondrial inducida por la Epicatequina en miotubos C2C12 (Modificado de Moreno-Ulloa et al., 2018)

Estos resultados son de gran relevancia ya que proporcionan evidencia de cómo la Epicatequina impacta favorablemente en la función de músculo esquelético (es decir, aumenta la resistencia a la fatiga y la capacidad oxidativa). No obstante, los resultados *in vitro* requieren una mayor validación *in vivo* para respaldar la participación de GPER en la mediación de los efectos de la Epicatequina.

### 1.7 La Epicatequina es la catequina que presenta el mayor número de efectos positivos en el músculo esquelético

En comparación con otros flavonoides, la existencia de epigallato e hidroxilo, así como el número y la posición de los dobles enlaces, contribuyen a las propiedades farmacológicas únicas de la Epicatequina [50]. La siguiente tabla resume algunos de los efectos de las catequinas en el músculo esquelético, donde Epicatequina: EC, Epicatequina galato: ECG, epigaloaloquina: EGC y epigaloaloquina-3-galato:

EGCG. Como se puede observar la Epicatequina es la catequina que presenta más efectos positivos en este órgano [51].

Ubicación	Efecto	EC	EGC	ECG	EGCG
<b>Músculo esquelético</b>	Promoción de la diferenciación de mioblastos.	+	-	+	+
	Promoción de la biogénesis mitocondrial	+	-	-	-
	Mantención de la homeostasis de proteínas	+	-	+	+
	Antioxidante y antifatiga	+	+	+	+
	Regulación del metabolismo de glucosa	+	-	+	+
	Regulación del metabolismo de lípidos	-	-	-	+
<b>Capilares</b>	Promoción de la angiogénesis	+	-	-	-
<b>Hueso</b>	Estimulación de la formación de huesos	-	-	+	+
<b>Nervio</b>	Neuro protección	+	+	+	+

Tabla 1. Comparación de los diferentes efectos de las catequinas en el músculo esquelético (modificado de Penghui Li et al., 2019).

Los mecanismos a través de los cuales la Epicatequina beneficia al músculo esquelético son en gran medida desconocidos. Sin embargo, se han propuesto diversas maneras en las que este compuesto beneficia al músculo esquelético las cuales se resumen en la Figura 7 y se describen a continuación.

Hasta ahora se sabe que este compuesto puede promover la diferenciación de mioblastos al estimular diversas vías de señalización pro-miogénicas, así como mejorar la diferenciación de las células madre musculares [52, 53]. Por un lado, se sabe que la miostatina es un inhibidor del crecimiento muscular que principalmente promueve la unión de Smad2/3 a MyoD inhibiendo su expresión. Esto reduce la diferenciación de mioblastos a miotubos [54]. Se piensa que la Epicatequina aumenta la expresión de folistatina, un inhibidor de la miostatina, entonces esto impide la inhibición de MyoD y por lo tanto mejora indirectamente la diferenciación miogénica [55].

Se ha planteado que la Epicatequina es un homólogo estructural de una familia de hormonas esteroideas activadoras del coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- $\alpha$ ) que inducen la biogénesis mitocondrial y la regeneración muscular, mejoran la función muscular y contribuyen al tratamiento exitoso de la distrofia muscular de Becker [56]. Las dietas ricas en Epicatequina estimulan la proliferación de capilares y mitocondrias de músculo esquelético en modelos murinos con disfunción muscular congénita y se ha planteado que los mecanismos reguladores podrían estar relacionados con la fosforilación potenciada por Epicatequina de las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) 3/6 y p38MAPK y la regulación positiva de PGC1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y marcadores del factor de transcripción mitocondrial A (T-fam). Todos estos factores están relacionados con la formación mitocondrial. Además, también se planteó que la Epicatequina puede estimular la aparición del factor de unión potenciador de miocitos-2A (MEF2A) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [57].

Como se observa en la Figura 7 la Epicatequina está compuesta estructuralmente por dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico que contiene oxígeno. La presencia de múltiples grupos hidroxilo fenólicos contribuye a las potentes propiedades antioxidantes de la EC, que pueden eliminar directa o indirectamente las especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una reacción química entre el hidroxilo y las ROS o mediante la regulación de los compuestos y enzimas eliminadores de la vía de las ROS [58]. También se piensa que podría inhibir al factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), reduciendo así la degradación mitocondrial de proteínas por el estrés oxidativo.

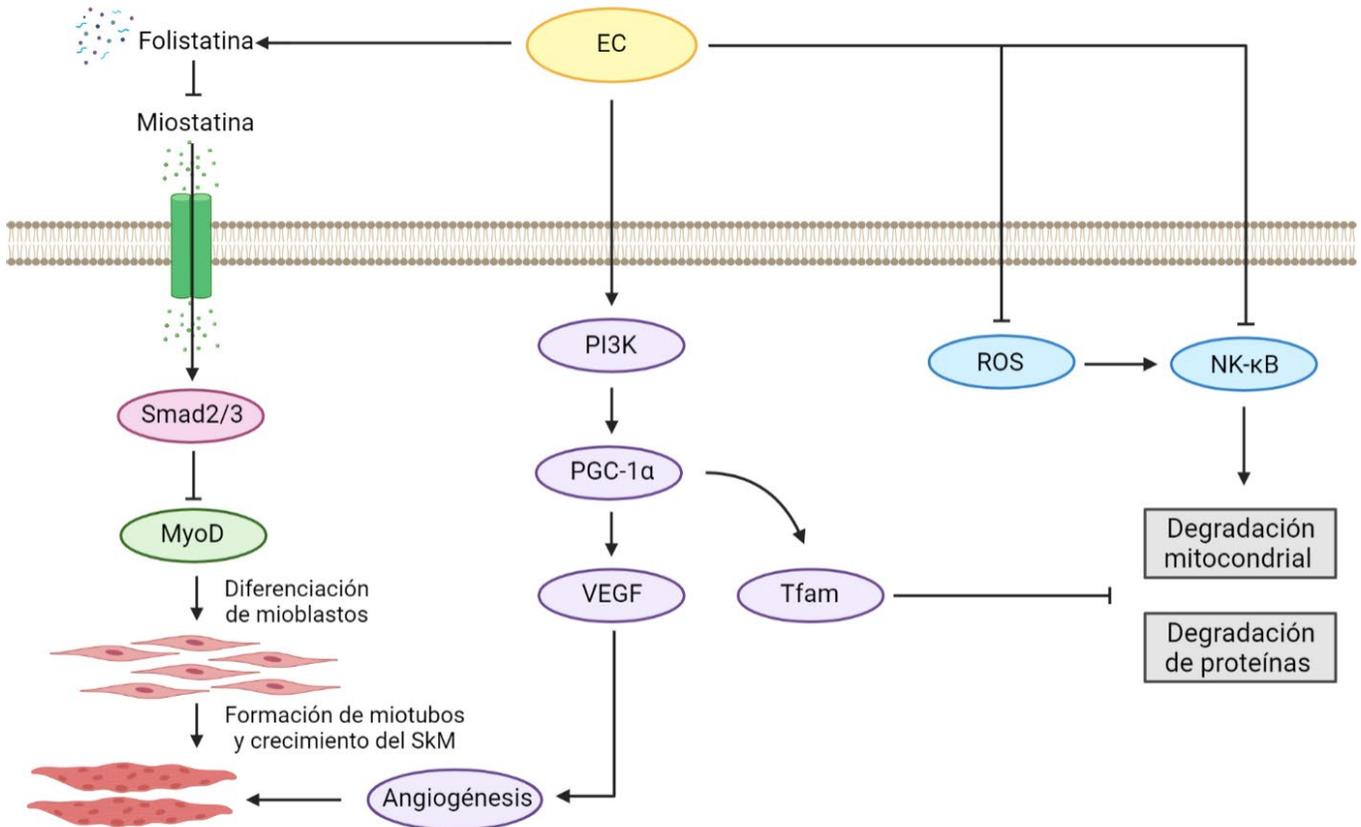


Figura 7. Efectos de la Epicatequina sobre el músculo esquelético (Diagrama modificado de Zhihao et al., 2020)

### 1.8 Estudios realizados en ratones y humanos sobre los beneficios de la Epicatequina en el músculo esquelético

Se ha demostrado que la Epicatequina provoca una reducción significativa de riesgos cardiometabólicos [59]. En un estudio se reportaron los efectos beneficiosos del consumo de cacao rico en Epicatequina sobre la biogénesis mitocondrial muscular de pacientes adultos mayores con insuficiencia cardíaca y diabetes mellitus tipo 2 [60]. Además, se demostró que la administración de este compuesto mejora sustancialmente los parámetros del estrés oxidativo en el músculo esquelético en un modelo de ratón resistente a insulina [61].

Así mismo, diversos grupos de investigación han informado que la Epicatequina promueve la remodelación mitocondrial, retrasando así la aparición

de fatiga [62]. Aunado a esto, estudios recientes han demostrado que puede reducir la adiposidad y aumentar la masa magra, así como la densidad mineral ósea (DMO) total en la descendencia masculina de ratas obesas [63, 64].

También se ha observado que la Epicatequina tiene el potencial de prevenir el desarrollo de miocardiopatía dilatada de origen genético [65] y que tiene efectos positivos en la regulación de la homeostasis de la glucosa [66].

Por otra parte, se ha observado que en ratones de 1 año el tratamiento con Epicatequina durante 2 semanas conduce a un aumento del ~ 50% de la capacidad de realizar ejercicio acompañada de una mayor capacidad oxidativa del músculo esquelético y angiogénesis [67, 68]. Estos resultados demostraron que al igual que con el ejercicio, la Epicatequina puede limitar la disminución de la función y estructura del músculo esquelético asociada a la edad.

En un estudio reciente [69], se estudió este compuesto como un agente reductor del estrés oxidativo al actuar como un regulador positivo de la estructura y función mitocondrial y de los sistemas de control de equilibrio redox en músculos esqueléticos y cardíacos de ratones distróficos nulos del gen  $\delta$ -sarcoglicano ( $\delta$ -SG). Los ratones silvestres y los ratones nulos de  $\delta$ -SG fueron tratados con Epicatequina (1 mg / kg, dos veces al día) durante 2 semanas. El tratamiento con Epicatequina dio como resultado la normalización significativa de la carbonilación proteica total, la recuperación de la relación glutatión/glutatión oxidado y una mejora en las actividades de la enzima superóxido dismutasa 2, catalasa y citrato sintasa. Además, se observó una mejora en la función del músculo esquelético.

En otro estudio se reportaron los efectos de la Epicatequina en ratones y los resultados de una prueba inicial en humanos, los niveles de miostatina y de  $\beta$ -galactosidasa aumentan con el envejecimiento, mientras que la folistatina, MyoD y miogenina disminuyen. En el estudio se observó que la Epicatequina disminuye la miostatina y la  $\beta$ -galactosidasa y aumenta los niveles de marcadores de

crecimiento muscular. Además, el tratamiento durante 7 días con Epicatequina aumentó la fuerza de agarre de la mano y la proporción de folistatina / miostatina en plasma [70]. Esto demostró que el consumo de cantidades moderadas de Epicatequina puede revertir parcialmente los efectos del envejecimiento sobre los moduladores del crecimiento/diferenciación muscular. Sin embargo, los mecanismos detrás de estas observaciones aún no han sido elucidados.

Debido a numerosos resultados exitosos como los mencionados anteriormente, la Epicatequina se ha incluido en el grupo de moléculas naturales con efectos que imitan el ejercicio físico y que podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades musculares adquiridas o genéticas y patologías metabólicas asociadas con el funcionamiento del músculo esquelético [71, 72, 73].

A pesar de que los efectos beneficiosos de la Epicatequina observados en el músculo esquelético son prometedores, su efecto sobre la proliferación y diferenciación de células musculares aún es en gran medida desconocido y todavía hay varias preguntas sin resolver sobre cómo da pie a estos resultados. Algunas de éstas incluyen: ¿Qué mecanismos regulan los efectos positivos de la Epicatequina sobre la regeneración y la actividad oxidativa del músculo esquelético? ¿La Epicatequina induce cambios en el fenotipo metabólico de la fibra muscular? De ser así, ¿depende este cambio del tipo de fibra muscular?, ¿La Epicatequina puede modificar la expresión de genes específicos de miosinas en los distintos tipos de fibras musculares?

## 2. Justificación y alcance del proyecto

Como se describió anteriormente, algunas enfermedades de desgaste muscular o que están relacionadas al músculo esquelético como la DMD, la sarcopenia, la diabetes tipo 2 y la obesidad afectan preferentemente a ciertos tipos de fibras musculares.

Aún no está claro por qué ciertas enfermedades musculares afectan preferentemente ciertos tipos particulares de fibra. Por lo tanto, comprender los efectos específicos del tipo de fibra de estos trastornos musculares, así como elucidar las vías de señalización que controlan la remodelación de miofibras puede proporcionar información importante sobre las patologías musculares y sus posibles tratamientos [74, 75].

Con base en lo anterior, se ha propuesto que los factores involucrados en vías de señalización de remodelación muscular podrían ser blancos terapéuticos viables para el tratamiento de este tipo de patologías. De hecho, se ha planteado que este tipo de condiciones podrían tratarse cambiando las características del tipo de fibra de fenotipos rápidos glicolíticos a lentos oxidativos o viceversa dependiendo de la enfermedad [76].

Ante este escenario, resulta evidente la necesidad de estudiar estrategias para la modulación farmacológica y dirigida del metabolismo del músculo esquelético con fines terapéuticos; tanto para la inducción de progenitores destinados a la regeneración como para la inducción del número de células troncales disponibles para eventos posteriores a la diferenciación. Por lo tanto, la modulación genética y farmacológica de las vías de señalización del músculo esquelético a través del uso de nuevos compuestos es una oportunidad terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades musculares [77].

La Epicatequina tiene numerosos beneficios en el músculo esquelético similares a los que proporciona el realizar ejercicio físico. Por ello se ha planteado que este compuesto podría funcionar como un coadyuvante en el tratamiento de enfermedades relacionadas al músculo esquelético. Sin embargo, aún se desconocen en gran medida los mecanismos que regulan dichos efectos. Tampoco se sabe si este compuesto puede modificar el fenotipo metabólico de los diferentes tipos de fibras musculares o si tiene la capacidad de modificar la expresión de genes específicos de miosinas en las miofibras.

### 3. Hipótesis

La administración de Epicatequina en células C2C12 favorecerá su diferenciación. También inducirá cambios en la expresión de los genes específicos de miosinas tipo I (MyHCI) y tipo IIB (MyHCIIB).

### 4. Objetivo principal

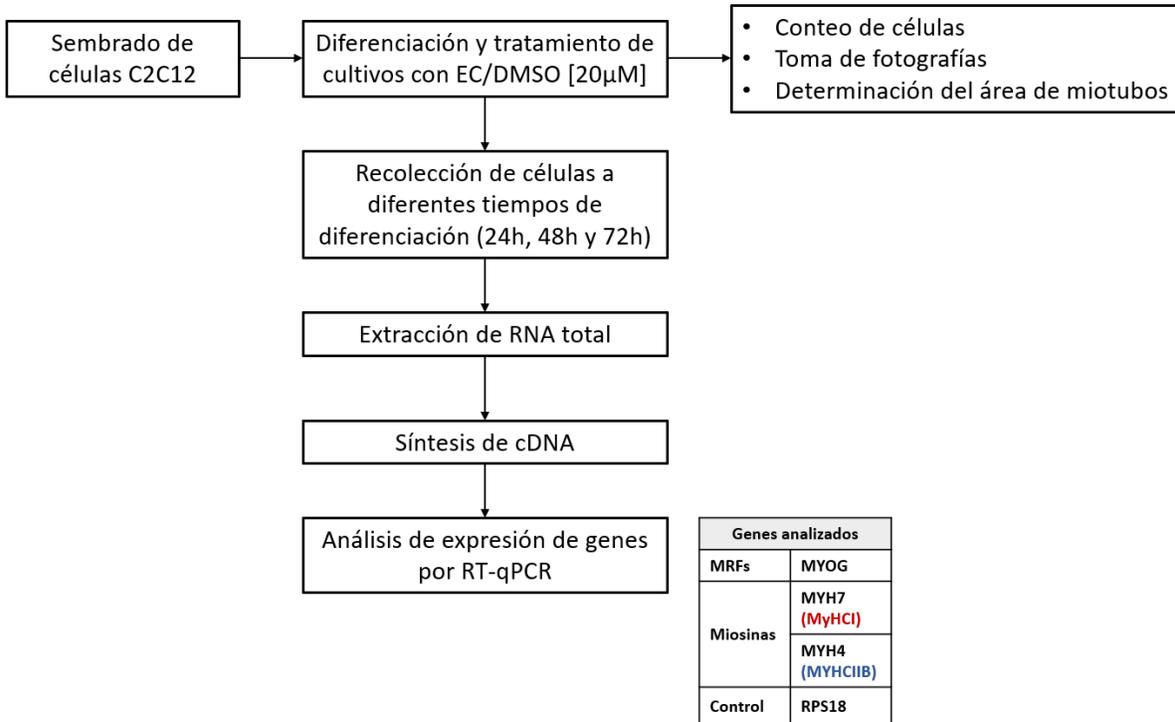
Determinar el efecto de la Epicatequina sobre los niveles de expresión de miosinas **tipo I (MyHCI)** y **tipo IIB (MyHCIIB)** del músculo esquelético del ratón.

### 5. Objetivos particulares

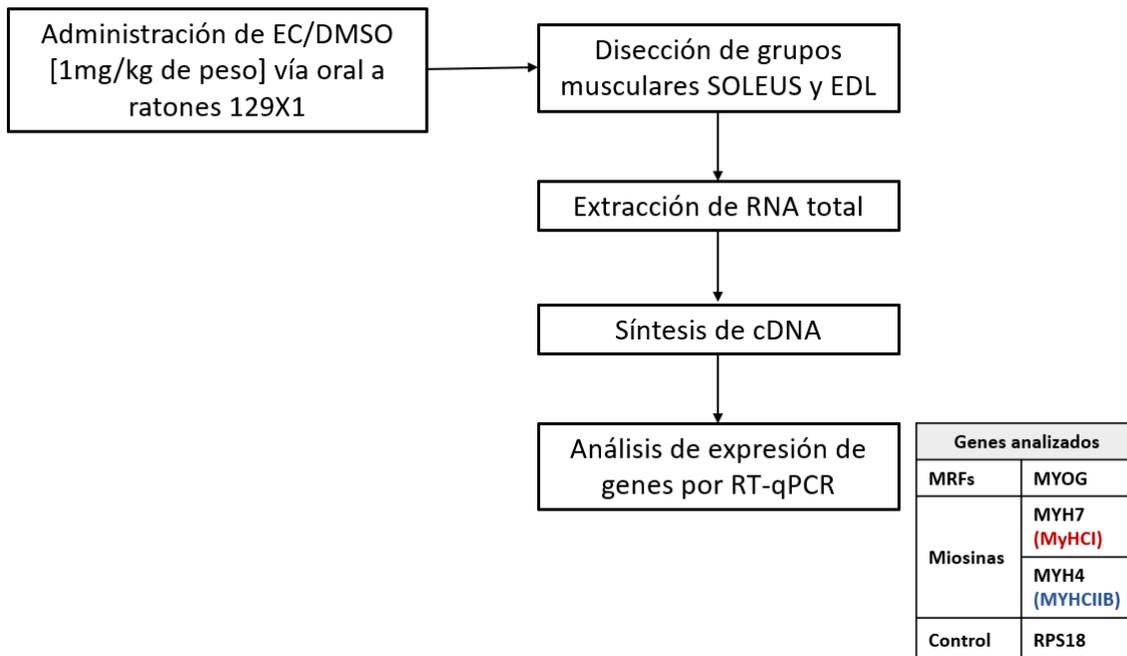
1. Determinar el efecto de la Epicatequina en la eficiencia de la diferenciación en cultivos C2C12.
2. Determinar si la Epicatequina puede ocasionar un cambio en la expresión de genes específicos de miosinas MYH7 **tipo I (MyHCI)** y MYH4 **tipo IIB (MyHCIIB)** *in vitro*.
3. Determinar si la Epicatequina puede ocasionar un cambio en la expresión de MYOG y de genes específicos de miosinas MYH7 **tipo I (MyHCI)** y MYH4 **tipo IIB (MyHCIIB)** *in vivo*.

## 6. Estrategia experimental general

### 6.1 Parte *in vitro*



### 6.2 Parte *in vivo*



## 7. Metodología

### 1. Cultivo celular (condiciones de crecimiento y diferenciación)

La línea celular empleada en este trabajo fue la C2C12 (ATCC CRL-1772), la cual corresponde a una línea celular inmortalizada de mioblastos de ratón. El medio de cultivo utilizado para mantener a las células C2C12 en condiciones de proliferación fue DMEM: Dulbecco`s Modified Eagle`s Medio) con 4.5 g/L de Glucosa y L-Glutamina (Santa Cruz Biotechnology™); 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Biowest™); 1% PSA: Penicilina-Streptomycina-Amfotericina B (10,000 IU/ml) (MP Biomedicals™). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para inducir la diferenciación, se reemplazó el medio de crecimiento con DMEM: Dulbecco`s Modified Eagle`s Medio con 4.5 g/L de Glucosa y L-Glutamina (Santa Cruz Biotechnology™); 1% SE: Suero Equino (Biowest™); 1% PSA: Penicilina-Streptomycina-Amfotericina B (10,000 IU/ml) (MP Biomedicals™). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 1.1 Sembrado de células

Cuando se alcanzó un 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración y las células fueron lavadas utilizando PBS estéril. Tras la eliminación del PBS fue añadida tripsina (1x Tripsin-EDTA, MP Biomedicals™) hasta cubrir la superficie de la placa e incubadas por 5 min a 37°C. Después las células fueron recuperadas y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células fueron re-suspendidas en medio de cultivo. Finalmente se contaron las células/mL por microscopía y cámara de Neubauer para sembrar el número correspondiente de células por pozo.

## 1.2 Determinación del efecto de la epicatequina sobre la proliferación celular

Se sembró un promedio de 125,000 células por pozo en placas de 6 pozos y se mantuvieron en condiciones de proliferación. Se esperaron 6 horas hasta que las células estuvieran adheridas a las placas. Pasado este tiempo se cambió el medio de cultivo por uno que contenía Epicatequina o DMSO a una concentración 20µM. Después de 48 horas se realizó un conteo celular mediante microscopía y cámara de Neubauer para determinar la cantidad de células por mL. Esta metodología se repitió 4 veces en total y se resume en la siguiente figura.

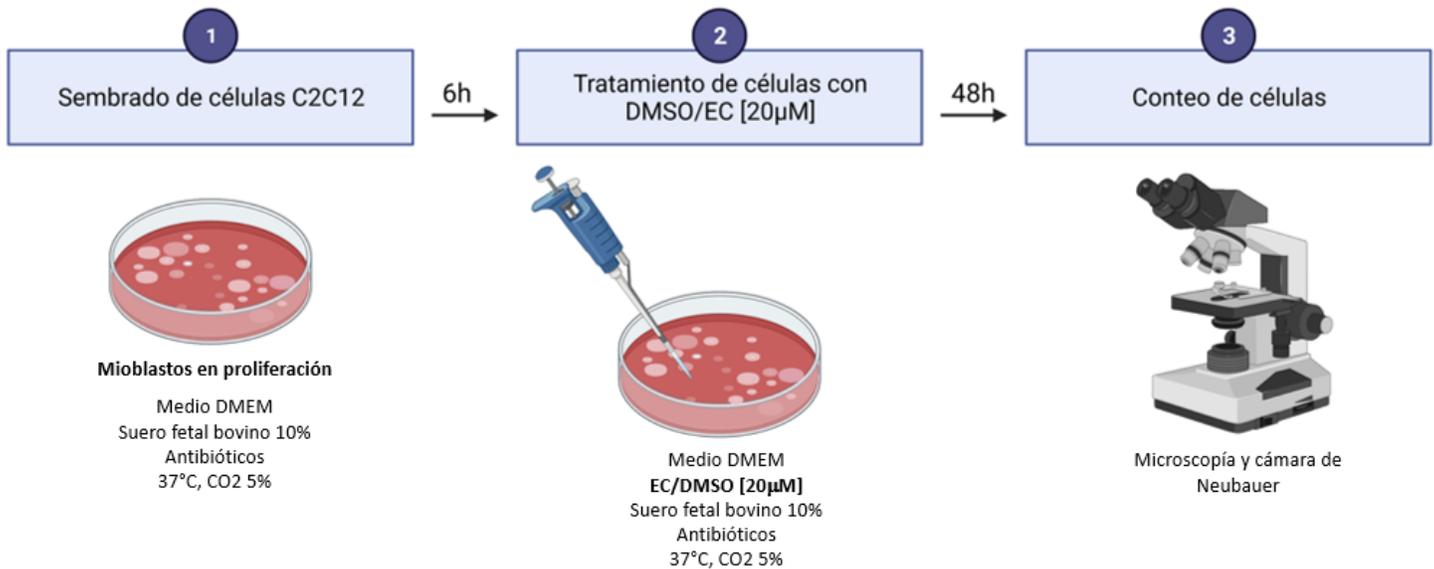


Figura 8. Ensayo de proliferación

## 1.3 Determinación del efecto de la epicatequina sobre la diferenciación celular

Se sembró un promedio de 125,000 células por pozo en placas de 6 pozos y se mantuvieron en condiciones de proliferación. Se esperaron 48 horas y se indujo la diferenciación con el medio correspondiente suplementado con Epicatequina o DMSO a una concentración 20 µM. Se recolectaron las células cada 24 horas y se

resuspendieron en 1mL de Trizol (Invitrogen™) y conservadas a -80°C. Esta metodología se repitió 4 veces en total y se resume en la siguiente figura.

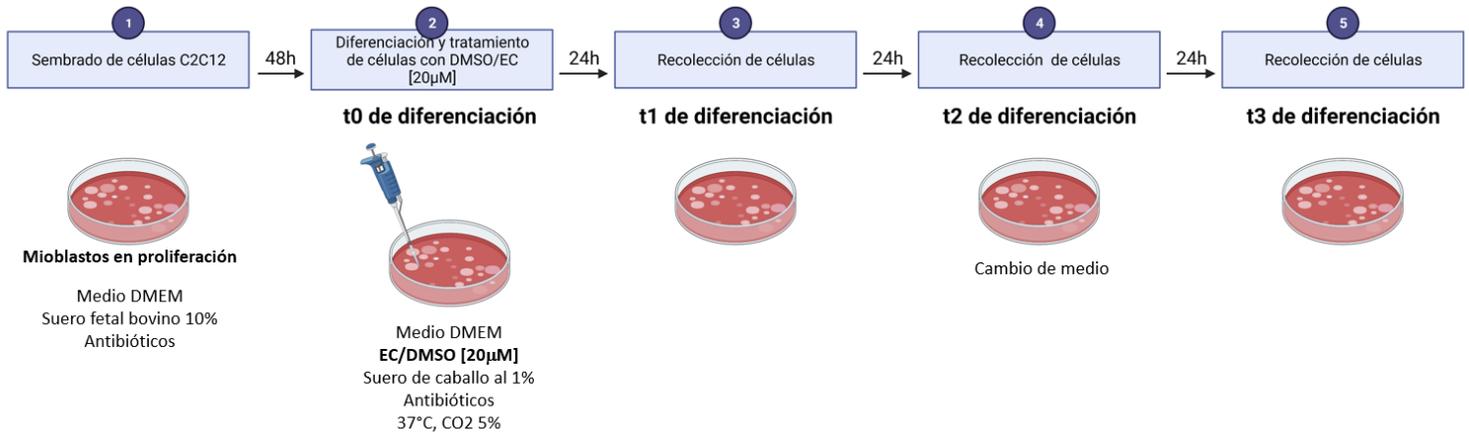


Figura 9. Ensayo de diferenciación

## 2. Ratones y disección de músculos

Se le administró una concentración de Epicatequina o DMSO de 1mg/kg de peso vía oral cada 12 horas durante 15 días a 2 grupos experimentales de 3 ratones de la cepa 129X1/SvJ. Una vez concluido el período de tratamiento, se realizó la disección de los músculos Soleus y EDL de la pierna de los ratones tratados con Epicatequina o DMSO, de acuerdo con la metodología descrita por Brun, C et al., 2017 [78] y que consta de lo siguiente.

Para la disección se sacrificó a cada ratón y se desinfectaron las patas posteriores con etanol al 70%. Se colocó al ratón boca arriba sobre una tabla de soporte. Se usaron tijeras Iris para cortar la piel alrededor del tobillo y luego se cortó con cuidado la piel proximalmente a lo largo de la pierna hasta la rodilla para exponer los músculos subyacentes. Después con unas pinzas Iris semicurvas, se levantó y retiró la piel y con ayuda de unas micro pinzas semicurvas, se retiró la fascia que rodea el tibialis anterior (TA), recorriendo la tibia desde el tobillo hasta la rodilla. Con ayuda de un aguja y unas tijeras de resorte Cohan-Vannas se hizo

visible el músculo a extraer. Luego se extrajo el músculo con unas pinzas Iris semicurvas y se cortó el tendón distal con unas tijeras de resorte Cohan-Vannas. Este procedimiento se repitió para aislar el músculo de la extremidad trasera contralateral. Después de la disección, cada músculo se colocó en un eppendorf, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (extracción de RNA total).

### **3. Extracción de RNA total**

#### **3.1 Extracción de RNA a partir de células**

Las células que se encontraban resuspendidas en 1mL de Trizol (Invitrogen™) y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron a temperatura ambiente y se homogenizaron. Después se centrifugaron a 12,000 g por 10 min, acto seguido se recuperó el sobrenadante y se añadieron 200µl de Cloroformo (MERK™) se homogenizó, se incubó por 3 min y se centrifugó a 12,000g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadieron 500µl de isopropanol (VWR™), se homogenizó, se incubó por 10 min y se centrifugó a 12,000g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 500 µl de una solución de etanol al 75% (Sigma™) y centrifugado a 12,000g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por último, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100µl de agua libre de RNAsas. Se procedió a la cuantificación de los RNAs totales obtenidos con el equipo Nanodrop™. Así mismo se verificó su integridad a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se tomó la imagen de este con el software ImageLab™.

#### **3.2 Extracción de RNA partir de tejidos**

A partir de los tejidos disectados se realizó extracción de RNA total por columnas con el kit Quick-RNA Miniprep Kit de ZYMO Research™ con base en el protocolo que se describe a continuación.

Los tejidos se disgregaron con tijeras iris en presencia del tampón RNA Lysis Buffer™. Para eliminar los restos de partículas del homogeneizado, se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo libre de nucleasas. Después se transfirió la muestra lisada en buffer de lisis a un filtro Yellow Spin-Away™ en un tubo de recolección y se centrifugó a 10,000-16,000 x g durante 30 segundos para eliminar la mayor parte del DNA genómico. Al sobrenadante se le agregó 1 volumen de etanol (95-100%) y se mezcló bien. Luego se transfirió la muestra a una columna Zymo-Spin™ IIICG1 (verde) en un tubo de recolección y se centrifugó a 10,000-16,000 x g durante 30 segundos. Se desechó el sobrenadante y se procedió al tratamiento con DNasa I. Para ello se lavó la columna con 400 µl de tampón de lavado de ARN y se centrifugó a 10,000-16,000 x g durante 30 segundos. Se desechó el sobrenadante y en un tubo libre de nucleasas, se añadieron 5 µl de DNasa I, 75 µl de buffer de digestión de DNA y se mezcló. Posteriormente se añadió la mezcla directamente a la matriz de la columna y se incubó a temperatura ambiente (20-30 °C) durante 15 minutos. Una vez pasado este tiempo se agregaron 400 µl de buffer de preparación de RNA a la columna y se centrifugó a 10,000-16,000 x g durante 30 segundos y se desechó el sobrenadante. Luego se añadieron 700 µl de buffer de lavado de RNA a la columna y se centrifugó a 10,000-16,000 x g durante 30 segundos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 400 µl de buffer de lavado de RNA y se centrifugó la columna a 10,000-16,000 x g durante 1 minuto para asegurar la eliminación completa del buffer de lavado. Luego se transfirió la columna a un tubo libre de nucleasas y se añadieron 100 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas directamente a la matriz de la columna y se centrifugó a 10,000-16,000 x g durante 30 segundos. El RNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### **4. Síntesis de cDNA**

Se empleó 1 microgramo de los RNAs totales obtenidos a partir de los cultivos y tejidos para la síntesis de cDNA mediante retro-transcripción (RT). Para tal efecto, por cada muestra, se realizó una mezcla A que contenía:

- 1  $\mu$ l de Oligo dT (500 $\mu$ g/mL) (Invitrogen™)
- 1  $\mu$ g de RNA total
- 1  $\mu$ l de mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP) (Invitrogen™)
- Agua libre de nucleasas hasta ajustar a 12  $\mu$ l

Esta mezcla fue calentada a 65°C por 5 min, posteriormente se colocó en hielo y se añadió la mezcla B que contenía:

- 4  $\mu$ l de Buffer First-Strand 5X (Invitrogen™)
- 2  $\mu$ l de DTT (0.1M) (Invitrogen™)
- 1  $\mu$ l de Agua libre de nucleasas

La mezcla se incubó en hielo por 2 min y posteriormente se añadió 1  $\mu$ L de la retro-transcriptasa M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l) (Invitrogen™). Después se incubó a 37°C durante 50 min y se inactivó la reacción elevando la temperatura a 70°C por 15 min.

## 5. PCR punto final

Para probar la especificidad de los primers u oligos que se emplearían para analizar la expresión de MYOG, MYH7 y MYH4 por PCR tiempo real (RT-qPCR) primero se evaluaron mediante PCR punto final. Se utilizó a RPS18 como control endógeno. Para este propósito, tras la retro-transcripción se procedió a la realización de la amplificación de los cDNAs obtenidos por PCR. Para esto se preparó la siguiente mezcla:

- 2.5  $\mu$ l del Buffer para PCR 10X (Invitrogen™)
- 0.75  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM) (Invitrogen™)
- 0.1  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Invitrogen™)
- 0.5  $\mu$ l dNTPs (10 mM) (Invitrogen™)
- 0.75  $\mu$ l de Primer Forward (10  $\mu$ M)
- 0.75  $\mu$ l del Primer Reverse (10  $\mu$ M)
- 2 $\mu$ l (1:100) de cDNA obtenido de la retro-transcripción
- 17.5  $\mu$ l de agua libre de nucleasas

Dicha mezcla se sometió a una incubación a 94°C por 2 min y posteriormente a 33 ciclos de:

- 94°C por 45 segundos
- 62°C por 35 segundos
- 72°C por 90 segundos

Posteriormente se sometió a 72°C por 7 minutos para realizar la extensión final y se incubó a 4°C hasta su uso. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa a 1.5%.

Para determinar que los primers sí eran aptos para su uso en RT-qPCR se hizo una curva con diferentes diluciones de cDNA y se determinó que presentaban la misma eficiencia sí. Esto para asegurarse que un aumento en la amplificación es debido a una mayor expresión y no a una mayor eficiencia de cierto primer en comparación con los demás.

## **6. PCR tiempo real (RT-qPCR)**

Para analizar la expresión de MYOG, MYH7 y MYH4 se utilizaron los cDNAs obtenidos y se empleó a RPS18 como control endógeno. Las secuencias de los primers se encuentran en la Tabla 1 de la sección “Anexos”. Las condiciones óptimas para la amplificación de cada secuencia fueron previamente establecidas utilizando el kit de amplificación PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific™) mediante una curva de estandarización. Para una reacción de 20 µl se utilizaron 5µl de la mezcla de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X), 6µl de cada primer, 2 µl de cDNA y el resto de agua libre de nucleasas como lo sugiere el fabricante (Termo Fisher Scientific™). La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en un equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) con incubaciones que incluyeron: un ciclo de 10 min a 95°C y 45 ciclos de: 10 min a 95°C y 1 min a 60°C. La determinación de la expresión relativa de todos los genes analizados por RT-qPCR en este trabajo se llevó a cabo por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Este método considera que [79]:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{control endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra tratada}) - \Delta Ct (\text{muestra no tratada})$$

## **7. Análisis por ImageJ (Fiji™)**

Se tomaron fotos en 5 diferentes campos de cada pozo con los cultivos tratados y no tratados a los distintos tiempos de diferenciación para evaluar si el tratamiento con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] ocasiona cambios en la morfología de los cultivos C2C12. Las imágenes obtenidas de los cultivos se analizaron con el programa ImageJ (Fiji™) para medir el área de los miotubos y obtener un estimado del tamaño de los mismos. Esta metodología se repitió 4 veces en total.

## **8. Análisis estadístico**

Para comparar los niveles de expresión de MYOG, MYH7 y MYH4 entre el grupo experimental tratado con Epicatequina y el grupo tratado con DMSO se utilizó una prueba de varianza de ANOVA de dos vías ya que se consideran 2 variables, tratamiento y tiempo [80]. El análisis estadístico se realizó a través del software GraphPad Prism 8™ y se consideró un valor  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. Esta metodología se llevó a cabo para todos los experimentos de este trabajo que consideran tratamiento y distintos tiempos de diferenciación. Para los experimentos en donde solamente se considera 1 variable (tratamiento) se empleó una prueba de varianza de ANOVA de una vía.

## 8. Resultados

### 1. Determinación del efecto de la Epicatequina en la proliferación de células C2C12.

La siguiente gráfica muestra la proliferación de cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o con DMSO en una concentración de [20 $\mu$ M]. La proliferación se tomó en cuenta como el número de células/mL de los cultivos. Como se puede observar en la gráfica, hubo un aumento significativo en la proliferación o células/mL de los cultivos tratados con Epicatequina en comparación de los cultivos tratados con DMSO. Estos resultados indican que el tratamiento con Epicatequina en células C2C12 incrementan su proliferación.

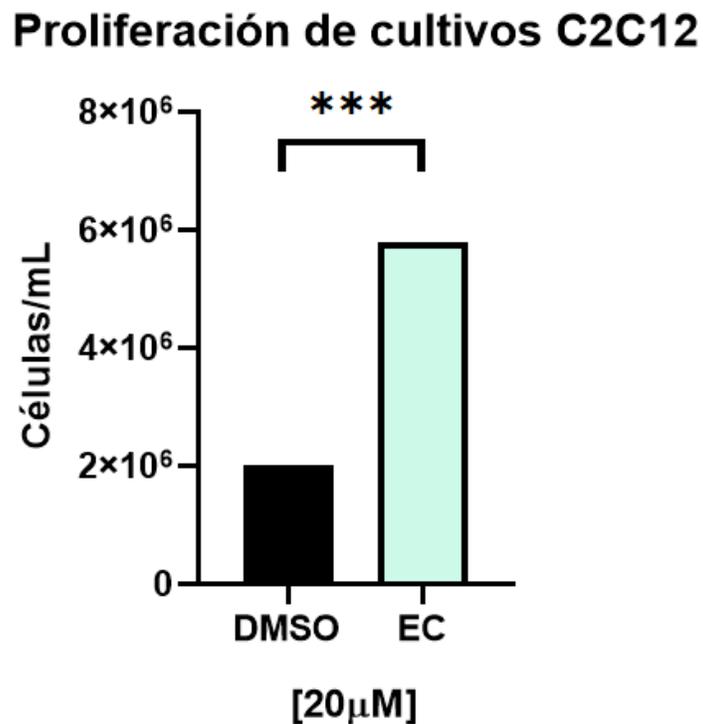


Figura 10. Conteo de células/mL a partir de cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M]. n=4

## **2. Determinación del efecto de la Epicatequina en la diferenciación de células C2C12**

Para determinar en qué momento de la diferenciación era óptimo realizar los tratamientos con Epicatequina o DMSO se evaluó el efecto de la Epicatequina en la proliferación de cultivos. Al observar un aumento en la proliferación al tratar los cultivos con Epicatequina y tomando en cuenta las observaciones hechas en la curva de crecimiento de control, se tomó la decisión de iniciar tratamientos desde el tiempo cero y durante 72h y no desde la proliferación de mioblastos. Esto para asegurar que los cambios observados fueran debido a los efectos de la Epicatequina o DMSO a partir de la diferenciación y no por los efectos que este compuesto tiene en la proliferación de cultivos C2C12.

Para observar los cambios en la morfología de cultivos C2C12 en respuesta al tratamiento con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] se realizó la toma de fotografías en microscopio de cuatro campos visuales de cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación (0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas). Estas imágenes se muestran en la siguiente figura.

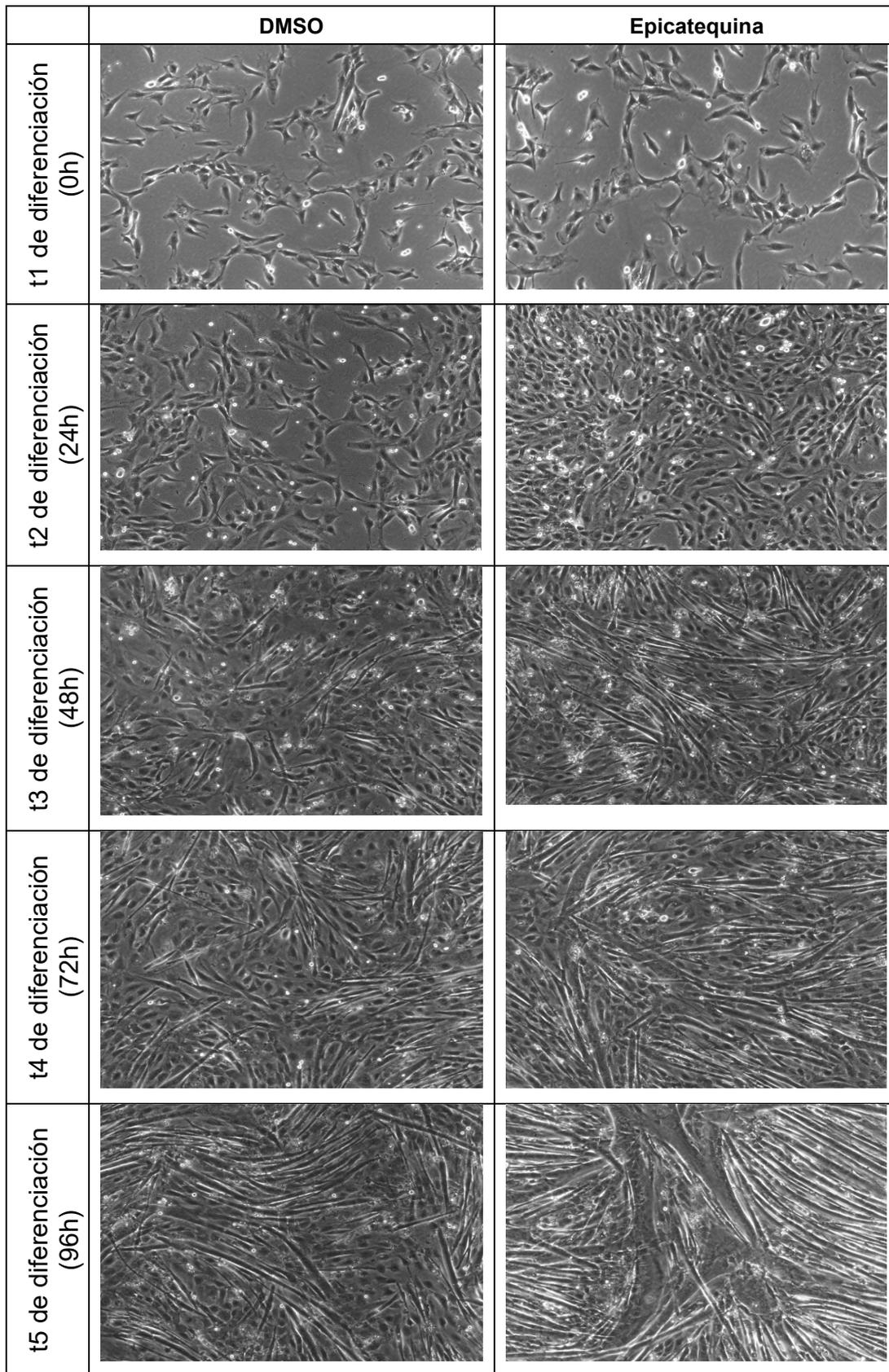


Figura 11. Fotos de cultivos C2C12 tratados con EC o DMSO [20  $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación (0h a 96h). n=4

En la columna izquierda podemos visualizar a los cultivos tratados con DMSO y en la columna derecha a los que fueron tratados con Epicatequina. Como se puede ver a nivel morfológico el tratamiento con Epicatequina [20 $\mu$ M] aumentó la proliferación de las células C2C12 además de que favoreció la formación de miotubos en número y en tamaño. Esta diferencia se puede apreciar con mayor facilidad en los últimos tiempos de diferenciación (48 horas, 72 horas y 96 horas). Estos cambios en la morfología en respuesta al tratamiento con Epicatequina sugieren que este compuesto tiene un efecto positivo en la diferenciación de cultivos C2C12.

Para determinar si había un cambio en el tamaño de los miotubos en respuesta al tratamiento con Epicatequina, las fotografías de los cultivos tomadas de cinco diferentes campos visuales se analizaron con el programa ImageJ (Fiji™) para medir el área aproximada por cada miotubo seleccionado. Este dato proporciona un estimado del tamaño de estos y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

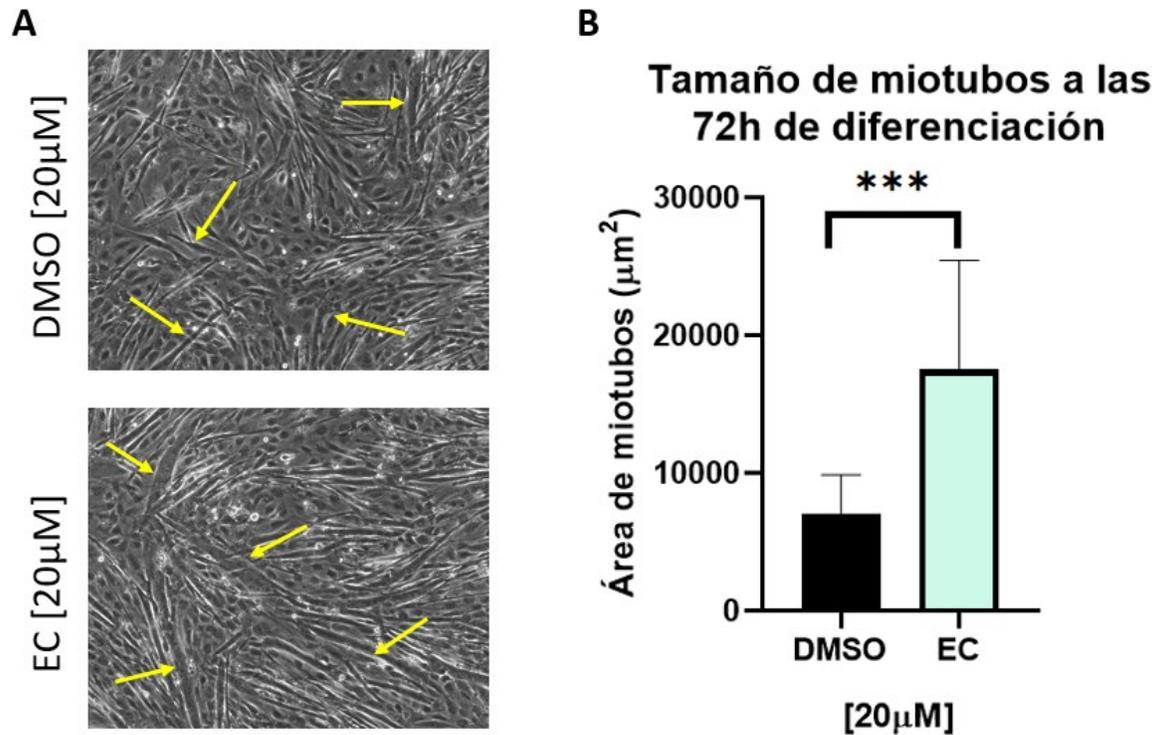


Figura 12. Área de miotubos ( $\mu\text{m}^2$ ) de cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu\text{M}$ ]. Medición realizada con ImageJ™. n=4

El panel A de la figura 12 representa los diferentes miotubos de los cuales se midió el área con el programa ImageJ (Fiji™). Como se muestra en el panel B, el área aproximada de los miotubos a las 72h de diferenciación en cultivos tratados con Epicatequina [20 $\mu\text{M}$ ] fue significativamente mayor en comparación con los miotubos de los cultivos tratados con DMSO [20 $\mu\text{M}$ ]. El aumento del área de miotubos C2C12 en respuesta al tratamiento con Epicatequina indica que este compuesto tiene un efecto positivo en la diferenciación de estas células.

### 3. Determinación del efecto de la Epicatequina en la expresión de MYOG en células C2C12.

Para corroborar los cambios morfológicos atribuidos a un efecto de la Epicatequina sobre la diferenciación de los cultivos, se evaluó la expresión de MYOG en respuesta al tratamiento con Epicatequina o DMSO. Como se mencionó en el marco teórico, MYOG es un importante factor de regulación miogénico en el

proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos y se considera como marcador de la diferenciación muscular. Para ello, primero se realizó la extracción de RNA total a partir de las células C2C12 tratadas con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] y cosechadas a los distintos tiempos de diferenciación (24h, 48h y 72h). Se procedió a la cuantificación de los RNAs totales obtenidos con el equipo Nanodrop™. Así mismo se verificó su integridad a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se tomó la imagen de este con el software ImageLab™ y se muestra a continuación.

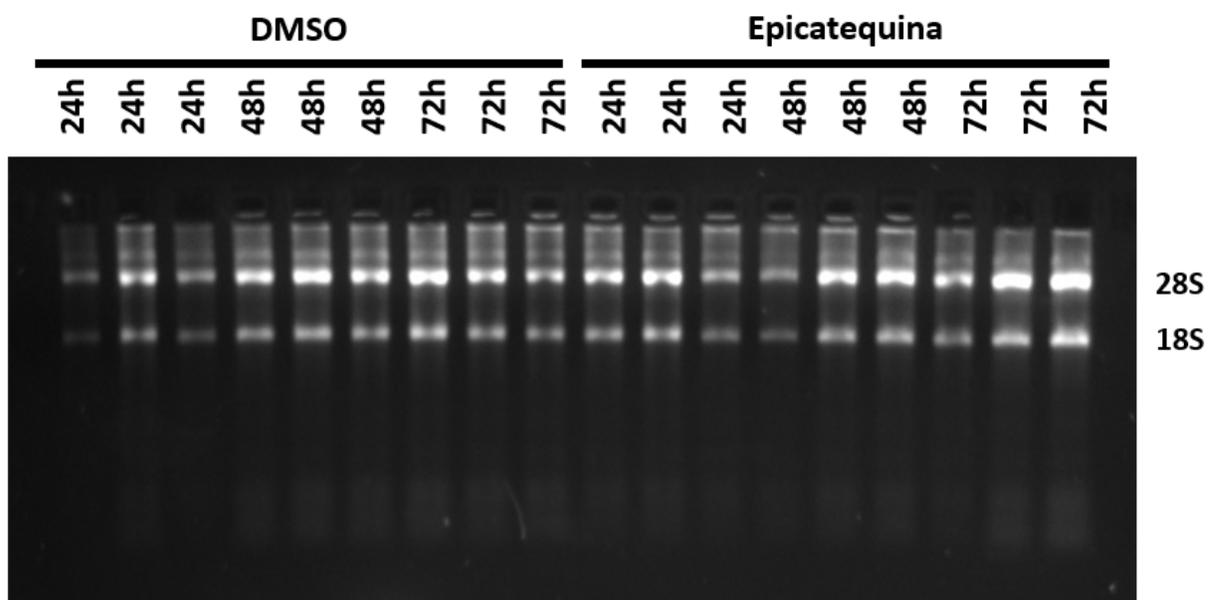


Figura 13. RNA totales a partir de cultivos tratados con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación.

La Figura 13 corresponde a la imagen de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra los RNAs totales obtenidos a partir de los cultivos tratados con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] a los distintos tiempos de diferenciación (24h, 48h y 72h). La primera banda corresponde al RNA ribosomal 28S y la segunda banda al RNA ribosomal 18S. Como se puede observar los RNAs totales obtenidos son íntegros.

Después se empleó 1 microgramo de los RNAs totales obtenidos a partir de los cultivos tratados con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] a los distintos tiempos de

diferenciación (24h, 48h y 72h) para la síntesis de cDNA mediante retro-transcripción (RT). Para probar la especificidad de los primers u oligos que se emplearían para analizar la expresión de MYOG por PCR tiempo real (RT-qPCR) primero se evaluaron mediante PCR punto final. Se utilizó a RPS18 como control endógeno. Para este propósito, tras la retro-transcripción se procedió a la realización de la amplificación de los cDNAs obtenidos por PCR.

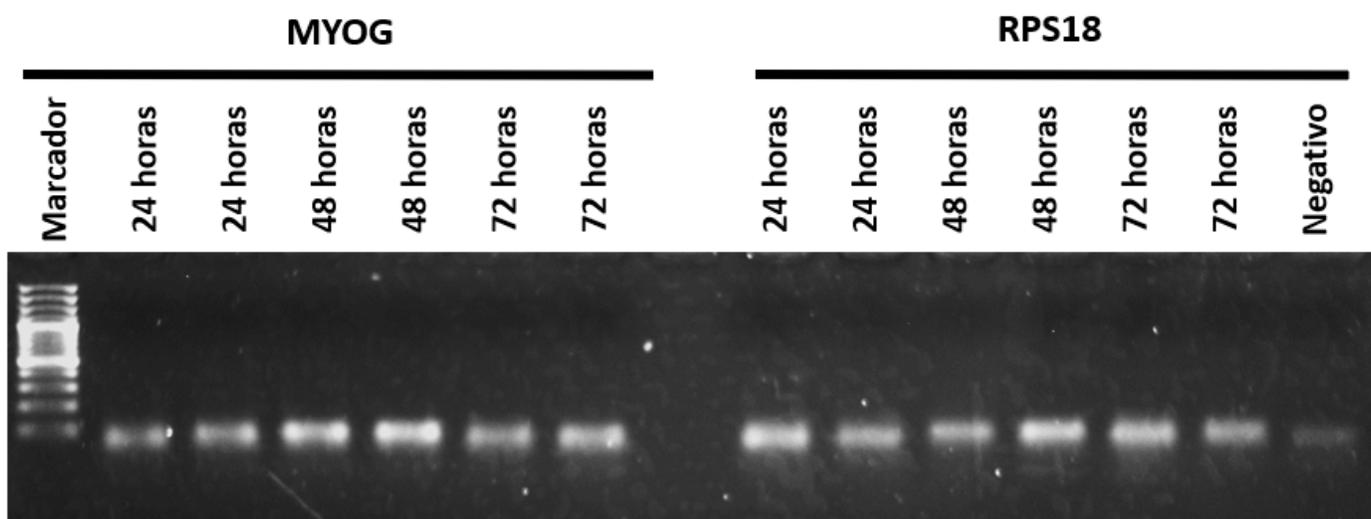


Figura 14. PCR punto final para los genes MYOG y RPS18 (control endógeno).

La Figura 14 corresponde a la imagen de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos PCR obtenidos a partir de la amplificación por PCR de los cDNAs obtenidos a partir de los cultivos tratados con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] a los distintos tiempos de diferenciación (24h, 48h y 72h). Los pasos que se siguieron para la obtención de los cDNAs se describen en la primera parte de la metodología. Como se puede observar, con los primers utilizados, se obtuvo un solo producto de PCR y en el caso del negativo no se observa la amplificación de ninguna banda.

Para determinar que los primers sí eran aptos para su uso en RT-qPCR se hizo una curva con diferentes diluciones de cDNA y se determinó que presentaban la misma eficiencia entre sí. Esto para asegurarse que un aumento en la amplificación es debido a una mayor expresión y no a una mayor eficiencia de cierto primer en comparación con los demás.

Se emplearon los cDNAs obtenidos a partir de los cultivos tratados con Epicatequina o DMSO [20  $\mu$ M] a los distintos tiempos de diferenciación (24h, 48h y 72h) para determinar la expresión relativa de MYOG mediante RT-qPCR y el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . El análisis estadístico consistió en una prueba de varianza de ANOVA de dos vías.

La siguiente gráfica muestra la expresión relativa del factor de regulación miogénico MYOG en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación (24 horas, 48 horas y 72 horas). A las 24 horas de diferenciación hubo una tendencia a la baja de la expresión relativa de MYOG en respuesta al tratamiento con Epicatequina. Lo mismo sucedió a las 48 horas de diferenciación. Por otro lado, a las 72 horas de diferenciación, se puede observar una tendencia a la alza en la expresión relativa de MYOG en los cultivos tratados con Epicatequina en comparación con los tratados con DMSO. Estos resultados sugieren que el tratamiento con Epicatequina podría modificar la expresión de MYOG en células C2C12. Sin embargo, estos resultados no son considerados estadísticamente significativos debido a que existe una gran variación entre las mediciones lo cual incrementa el margen de error de los resultados. Esto se puede deber a las repeticiones experimentales, por lo tanto, para determinar si realmente existe este efecto o no, se tendrán que realizar un mínimo de tres repeticiones en cada experimento.

## Expresión de MYOG en C2C12

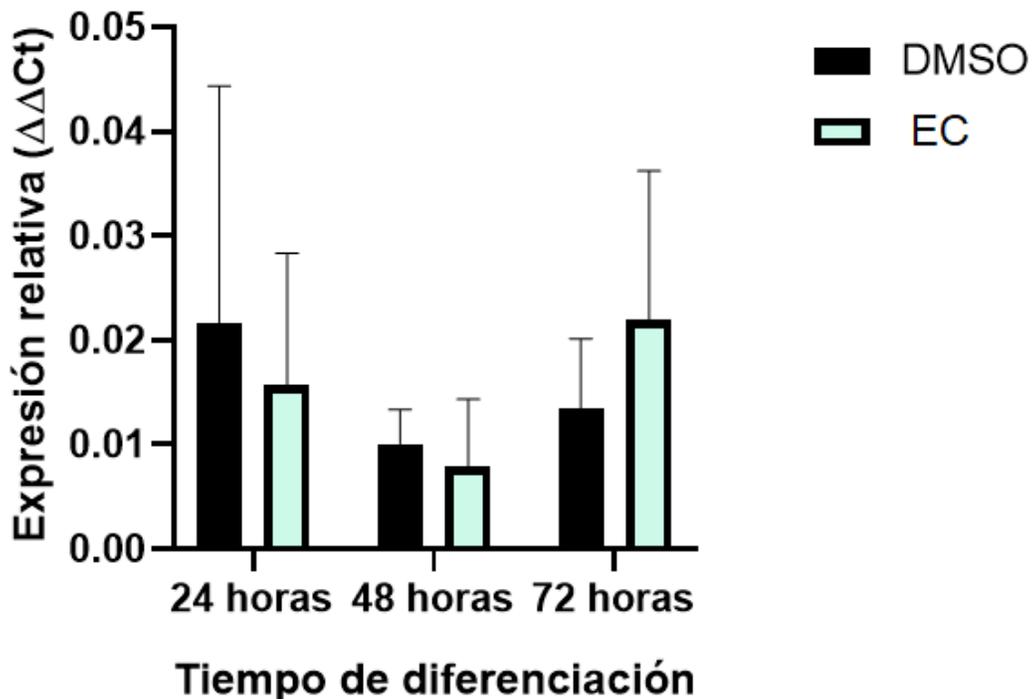


Figura 15. Expresión relativa de MYOG en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación. n=2

Con estos ensayos se abordó el objetivo particular número 1, que enuncia: **Determinar el efecto de la EC en la eficiencia de la diferenciación en cultivos C2C12.**

#### **4. Determinación del efecto de la Epicatequina sobre la expresión de MYH7 y MYH4 en células C2C12.**

Para determinar si la administración de Epicatequina podía ocasionar un cambio en la expresión de genes específicos de miosinas MYH7 que codifica a la miosina oxidativa de contracción lenta tipo 1 (MyHCI) y MYH4 que codifica a la miosina glicolítica de contracción rápida tipo IIB (MyHCIIB) en un sistema *in vitro* se determinó la expresión relativa de estos genes mediante RT-qPCR y el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . El análisis estadístico consistió en una prueba de varianza de ANOVA de dos vías.

La siguiente gráfica muestra la expresión relativa de MYH7 que codifica a la miosina oxidativa de contracción lenta MyHC1 o tipo 1 en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20µM] a diferentes tiempos de diferenciación (24 horas, 48 horas y 72 horas). A las 24 horas de diferenciación hubo una tendencia a la baja de la expresión relativa de MYH7 en respuesta al tratamiento con Epicatequina. Lo mismo sucedió a las 48 horas de diferenciación, pero en una proporción menor. Por otro lado, a las 72 horas de diferenciación, se puede observar una tendencia a la alza en la expresión relativa de MYH7 en los cultivos tratados con Epicatequina en comparación con los tratados con DMSO. Estos resultados sugieren que el tratamiento con Epicatequina podría modificar la expresión de MYH7 en células C2C12. Sin embargo, para considerar que este cambio es estadísticamente significativo, se deberán realizar un mínimo de tres repeticiones en cada experimento.

## Expresión de MYH7 (MyHCI) en C2C12

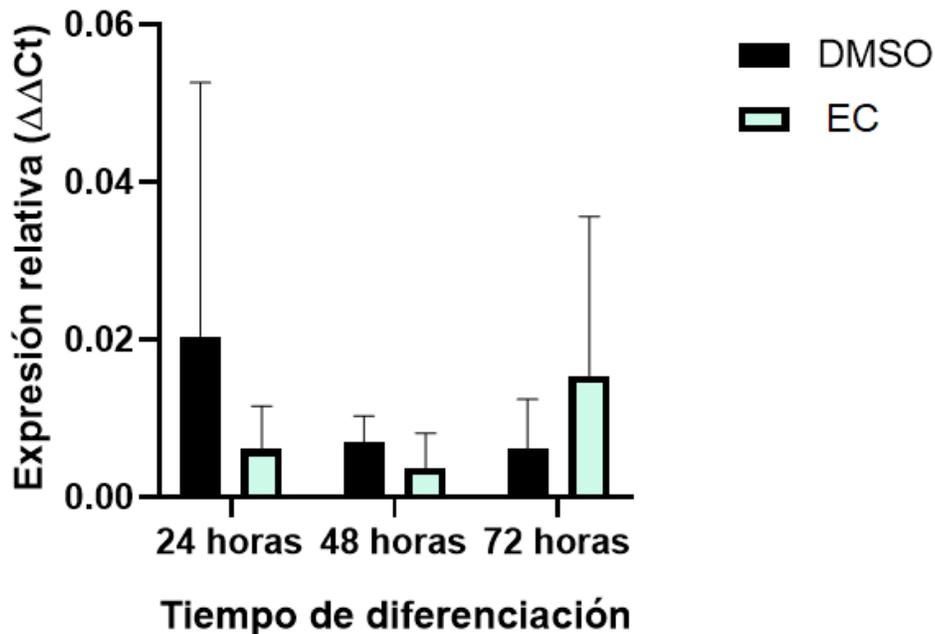


Figura 16. Expresión relativa de MYH7 (MyHCI) en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación. n=2

La Figura 17 muestra la expresión relativa de MYH4 que codifica a la miosina glicolítica de contracción rápida MyHCIIB o tipo 2 en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación (24 horas, 48 horas y 72 horas). A las 24 horas de diferenciación hubo una tendencia a la baja de la expresión relativa de MYH4 en respuesta al tratamiento con Epicatequina. Lo mismo sucedió a las 48 horas de diferenciación, pero en una proporción menor. Por otro lado, a las 72 horas de diferenciación, se puede observar una ligera tendencia a la alza en la expresión relativa de MYH7 en los cultivos tratados con Epicatequina en comparación con los tratados con DMSO al igual que en el caso de MYH4 (Figura 28). Estos resultados sugieren que el tratamiento con Epicatequina podría modificar la expresión de MYH4 en células C2C12. Sin embargo, para corroborar esta tendencia a la alza se necesitarán realizar más experimentos para que se pueda considerar un resultado estadísticamente significativo.

## Expresión de MYH4 (MyHClIB) en C2C12

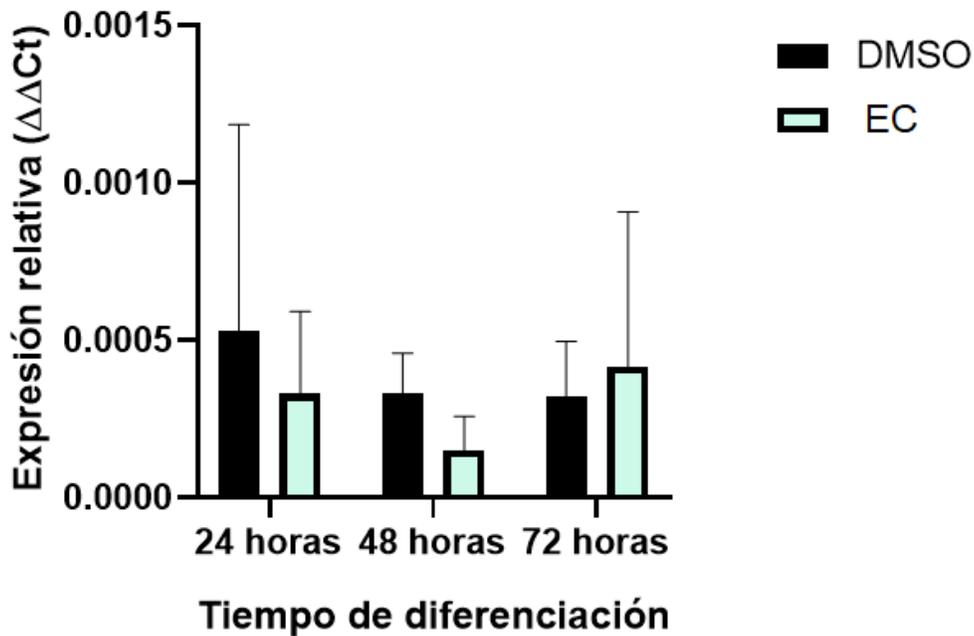


Figura 17. Expresión relativa de MYH4 (MyHClIB) en cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] a diferentes tiempos de diferenciación. n=2

Con estos ensayos se abordó el objetivo particular número 2 que enuncia: **Determinar si la EC puede ocasionar un cambio en la expresión de genes específicos de miosinas MYH7 tipo I (MyHCl) y MYH4 tipo IIB (MyHClIB) *in vitro*.**

### **5. Determinación del efecto de la Epicatequina en la expresión de MYOG, MYH7 y MYH4 en tejidos del músculo esquelético de ratón**

Para determinar si la administración de Epicatequina podía ocasionar un cambio en la expresión de MYOG y genes específicos de miosinas MYH7 y MYH4 en un sistema *in vivo* se determinó la expresión relativa de estos genes mediante RT-qPCR y el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . El análisis estadístico consistió en una prueba de varianza de ANOVA de una vía.

La siguiente gráfica muestra la expresión relativa de MYOG en músculo Soleus de ratones a los que se les administró Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. Se puede observar un incremento en la expresión relativa de MYOG en músculo Soleus, enriquecido en fibras de contracción lenta de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO. Como se mencionó en la sección de metodología, no se obtuvo el mismo número de RNAs totales a partir de los ratones tratados con Epicatequina o DMSO para cada tipo de músculo. Debido a esta discrepancia en el número de datos en cada grupo experimental, no fue posible llevar a cabo un análisis estadístico pertinente para obtener significancia estadística. Se tendrán que realizar repeticiones de este experimento para determinar si este cambio observado por la administración de Epicatequina es significativo o no.

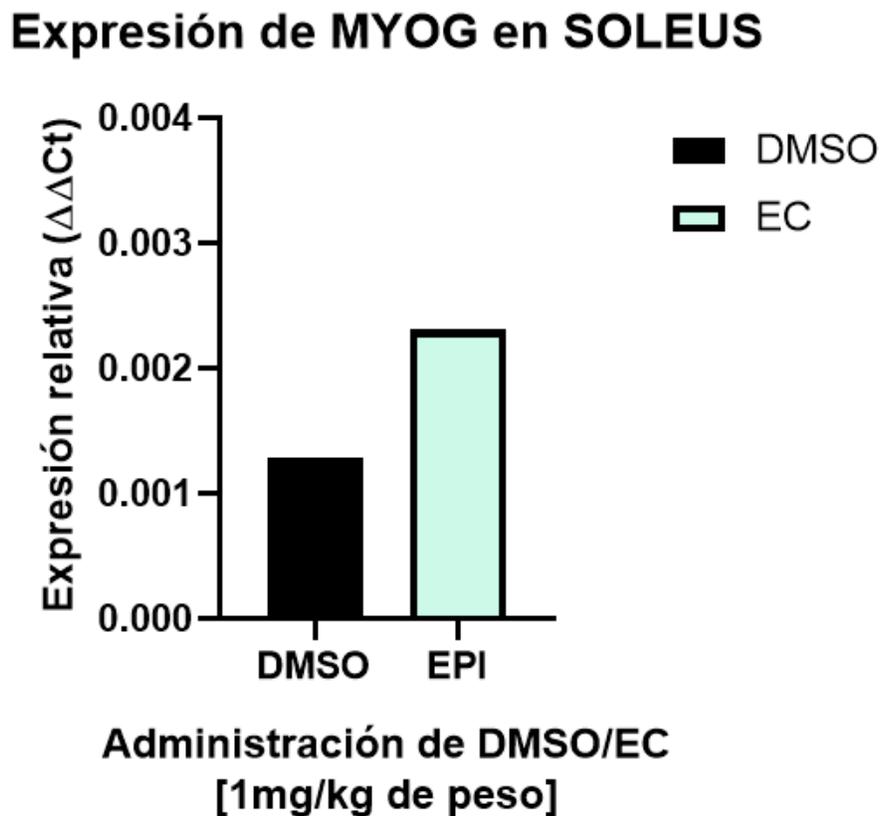


Figura 18. Expresión relativa de MYOG en Soleus de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2

La Figura 19 muestra la expresión relativa de MYOG en músculo EDL de ratones a los que se les administró Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. Se puede observar un ligero incremento en la expresión relativa de MYOG en músculo EDL enriquecido en fibras de contracción rápida de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO. Este incremento en la expresión de MYOG en EDL es menor al que se observó en Soleus (Figura 30). Se tendrán que realizar repeticiones de este experimento para determinar si este cambio observado por la administración de Epicatequina es significativo o no.

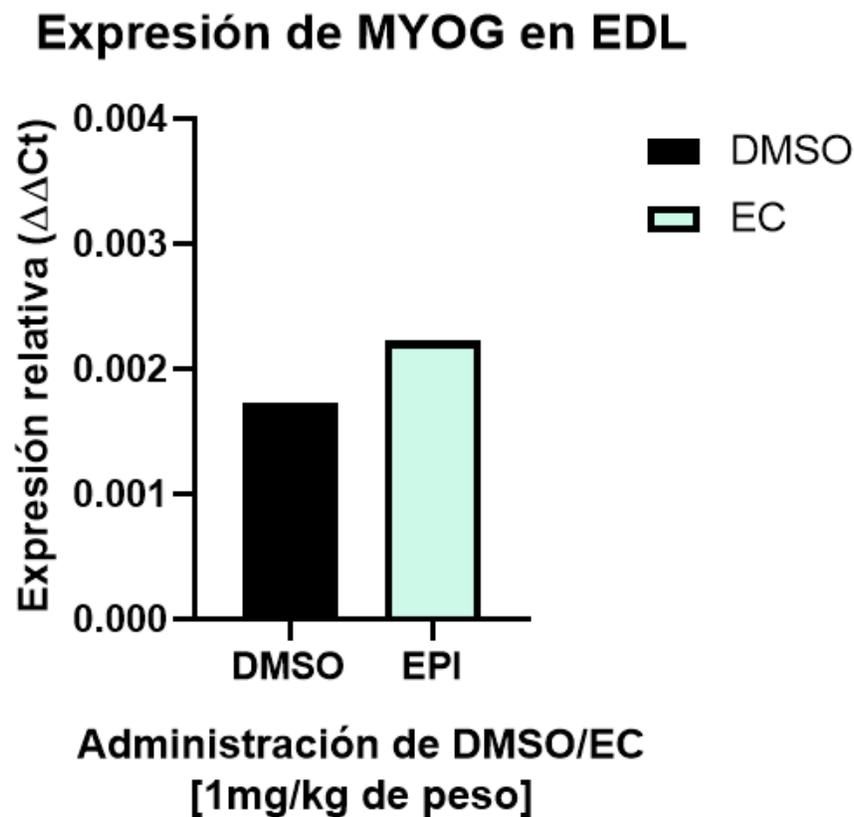


Figura 19. Expresión relativa de MYOG en EDL de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2

En la siguiente gráfica se observa la expresión relativa de MYH7 que codifica a la miosina oxidativa de contracción lenta MyHCI o tipo 1 en músculo Soleus de ratones a los que se les administró Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. Se observa que la administración de Epicatequina incrementó la expresión relativa de MYH7 en músculo Soleus de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO. Como se menciona en el marco teórico, el músculo Soleus es un músculo oxidativo de contracción lenta que está constituido en gran parte por fibras que expresan la cadena pesada de miosina MyHCI. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la administración de Epicatequina induce aún más la expresión de esta miosina en músculo Soleus.

### Expresión de MYH7(MyHCI) en SOLEUS

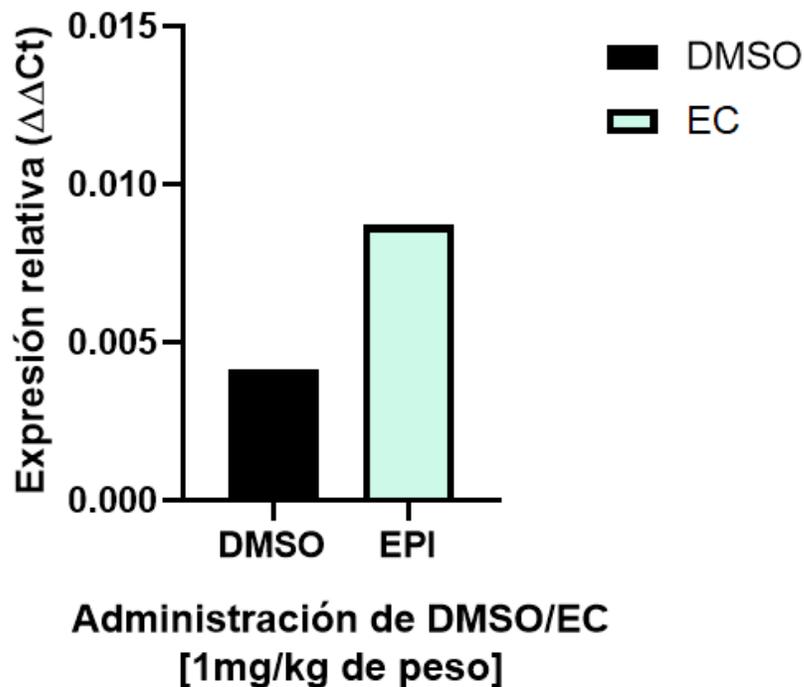


Figura 20. Expresión relativa de MYH7 (MyHCI) en Soleus de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2

La siguiente gráfica muestra la expresión relativa de MYH4 que codifica a la miosina glicolítica de contracción lenta MyHCIIIB o tipo 2B en músculo Soleus de ratones a los que se les administró Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. Se observa que la administración de Epicatequina reduce ligeramente la expresión relativa de MYH4 en músculo Soleus de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO. Sin embargo, se tendrán que realizar repeticiones de este experimento para determinar si este cambio observado por la administración de Epicatequina es significativo o no.

### Expresión de MYH4(MyHCIIIB) en SOLEUS

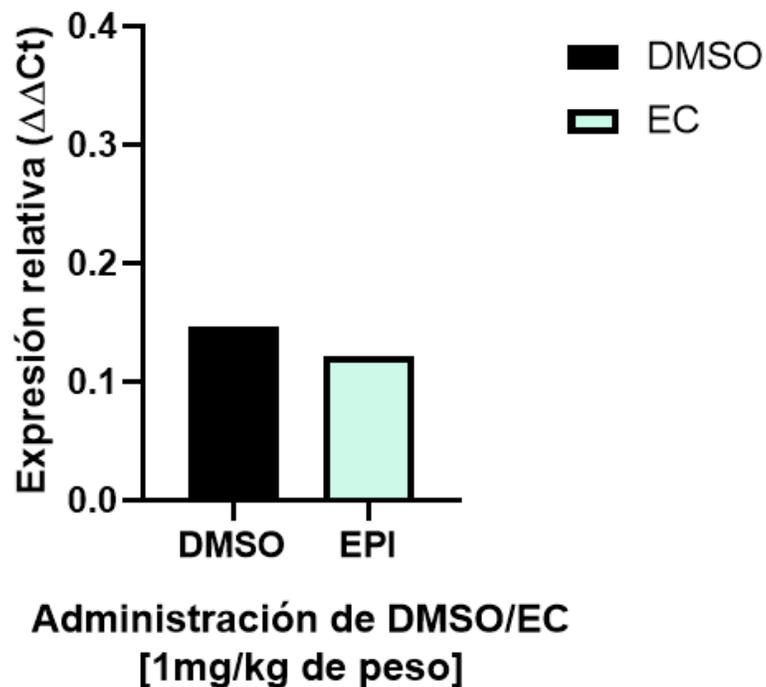


Figura 21. Cambios en la expresión relativa de MYOG en los músculos Soleus y EDL de ratones con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso].

La Figura 22 muestra la expresión relativa de MYH7 que codifica a la miosina oxidativa de contracción lenta MyHC I o tipo I en músculo EDL de ratones a los que se les administró Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. En este panel podemos observar un incremento notable en la expresión relativa de MYH7 en músculo EDL de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO. Como ya se mencionó, la miosina tipo I se considera característica del músculo Soleus, que es oxidativo de contracción lenta mientras que el músculo EDL es de contracción rápida y expresa la miosina tipo IIB. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la Epicatequina tiene el potencial para inducir la expresión de fibras oxidativas de contracción lenta en un músculo glicolítico de contracción rápida. Si estos resultados se corroboran más adelante, todo apuntaría a que la administración de Epicatequina no solamente puede estimular un cambio de metabolismo si no también el recambio de fibras musculares.

### Expresión de MYH7(MyHC I) en EDL

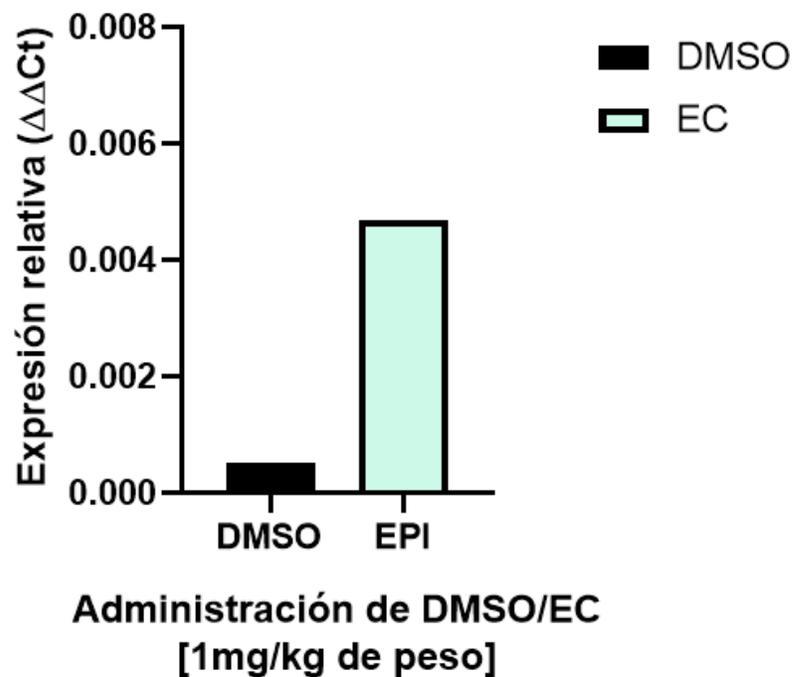


Figura 22. Expresión relativa de MYH7 (MyHC I) en EDL de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2

La Figura 23 muestra la expresión relativa de MYH4 que codifica a la miosina glicolítica de contracción rápida MyHCIIB o tipo IIB en ratones a los que se les administró Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. En este panel podemos observar que no existe un cambio en la expresión relativa de MYH4 en músculo EDL de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO.

### Expresión de MYH4(MyHCIIB) en EDL

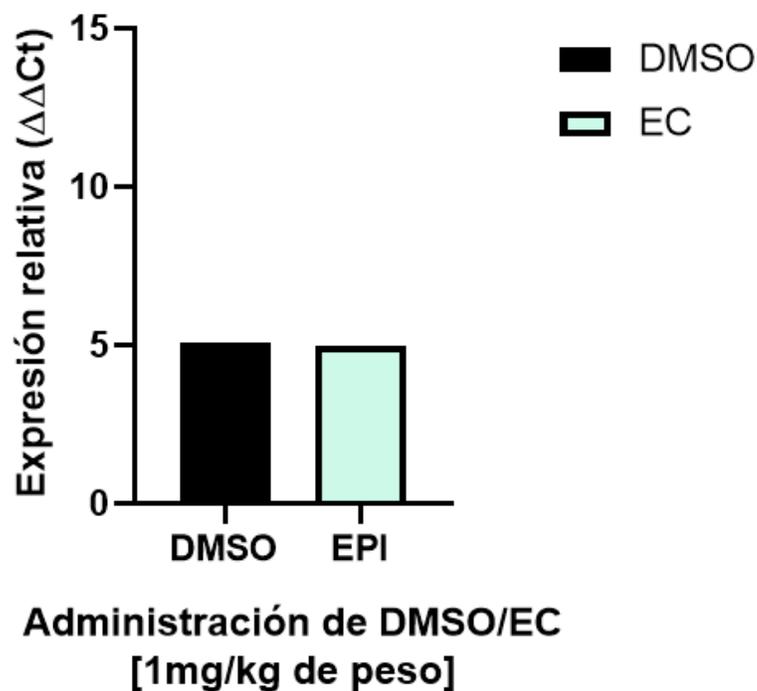


Figura 23. Expresión relativa de MYH4 (MyHCIIB) en EDL de ratones tratados con Epicatequina o DMSO [1mg/kg de peso]. n=2

Con estos ensayos se abordó el objetivo particular número 3, que enuncia: **Determinar si la EC puede ocasionar un cambio en la expresión de MYOG y de genes específicos de miosinas MYH7 tipo I (MyHCI) y MYH4 tipo IIB (MyHCIIB) *in vivo*.**

## 9. Discusión

A partir de los resultados obtenidos se observó un aumento significativo en la proliferación o células/mL de los cultivos tratados con Epicatequina en comparación con los cultivos tratados con DMSO. A nivel morfológico el tratamiento con Epicatequina [20 $\mu$ M] aumentó la proliferación de las células C2C12 además de que favoreció la formación de miotubos en número y en tamaño. Además, el área aproximada de los miotubos a las 72h de diferenciación en cultivos tratados con Epicatequina fue significativamente mayor en comparación con los miotubos de los cultivos tratados con DMSO. Por otro lado, a nivel de marcadores moleculares, a las 72 horas de diferenciación, se observó una tendencia a la alza en la expresión relativa de MYOG, un factor de regulación miogénico clave en la diferenciación de mioblastos, en los cultivos tratados con Epicatequina en comparación con los tratados con el control. Estos cambios coinciden con el planteamiento de que este compuesto puede estimular algunas vías de señalización pro-miogénicas. Por ejemplo, la Epicatequina aumenta la expresión de la folistatina, un inhibidor de miostatina y esto mejora la diferenciación de mioblastos y por lo tanto la formación de miotubos. La miostatina, es un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y puede unirse al receptor ActRIIA/B en la membrana celular, activar Smad 2/3 así como su respuesta en cascada, y regular negativamente el crecimiento del músculo [81]. En mioblastos, la miostatina puede inhibir la expresión de MyoD a través de Smad3, inhibiendo así la diferenciación del músculo esquelético [82]. El mecanismo que se ha propuesto a través del cual la Epicatequina puede regular al alza la expresión de folistatina es que se une al extremo C-terminal de la miostatina e inhibe la interacción entre la miostatina y sus receptores posteriores, en consecuencia, inhibiendo la función fisiológica de la miostatina [83].

Así mismo, el efecto positivo de la Epicatequina en la diferenciación de células C2C12 también puede explicarse con el planteamiento de que este compuesto es un homólogo estructural de una familia de hormonas esteroides activadoras del

coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- $\alpha$ ) que inducen la progresión del linaje miogénico [84]. Los mecanismos reguladores involucrados en la proliferación y diferenciación celular podrían estar relacionados con la fosforilación potenciada por Epicatequina de las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) 3/6 y p38MAPK y la regulación positiva de PGC1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y marcadores del factor de transcripción mitocondrial A (T-fam). Además, también se ha planteado que la Epicatequina puede estimular la aparición del factor de unión potenciador de miocitos-2A (MEF2A) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [85]. Aunque el análisis de expresión de MYOG es un experimento que debe repetirse para determinar si este cambio es significativo o no, los cambios morfológicos inducidos por la Epicatequina sugieren que este compuesto aumenta la eficiencia de la diferenciación de cultivos C2C12.

En cuanto al cambio en la expresión de genes específicos de miosinas en células C2C12, a las 72 horas de diferenciación, se observó una tendencia a la alza en la expresión relativa de MYH7 que codifica a la miosina oxidativa de contracción lenta tipo I y MYH4 que codifica a la miosina glicolítica de contracción rápida tipo IIB en los cultivos tratados con Epicatequina en comparación con los tratados con DMSO. Estos resultados sugieren que el tratamiento con este compuesto podría modificar la expresión de MYH7 y MYH4 en células C2C12. Estos resultados coinciden con el planteamiento de que la Epicatequina induce la diferenciación de mioblastos al (1) promover la producción de cadena pesada de miosina (MHC) al aumentar la expresión del factor regulador miogénico (MyoD, Myf5, MyoG) y el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) [86, 87], regulando así directamente la diferenciación de las células C2C12 y (2) mejorando indirectamente el desarrollo del músculo esquelético al inhibir la actividad de la miostatina. Los mecanismos a través de los cuales la Epicatequina induce la expresión de reguladores miogénicos como MYOD, MYOG, MYF5, MYH7 y MYH4 aún no se han dilucidado. Sin embargo, se ha planteado que podrían coincidir con las vías que se ven afectadas por otra catequina, la Epicatequin galato que se ha visto que induce la expresión de factores de regulación miogénicos activando la vía de señalización

PI3K/Akt, induciendo así la diferenciación miogénica y promoviendo la regeneración muscular [88].

En tejidos se observó un incremento en la expresión relativa de MYOG en músculo Soleus de contracción lenta de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con el DMSO. En el caso del músculo EDL, aunque menor, también hubo una tendencia a la alza de la expresión relativa de MYOG para el caso de los ratones tratados con Epicatequina. Por otro lado, la administración de este compuesto aumentó la expresión relativa de MYH7 en músculo Soleus y no cambió la expresión de MYH4 en Soleus o EDL. Por último, el cambio más importante que se observó fue que la administración de Epicatequina aumentó notablemente la expresión relativa de MYH7 en músculo EDL de ratones tratados con Epicatequina en comparación de los ratones tratados con DMSO. Como ya se mencionó, la miosina tipo I se considera característica del músculo Soleus, que es oxidativo de contracción lenta mientras que el músculo EDL es de contracción rápida y expresa la miosina tipo IIB. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la Epicatequina tiene el potencial para inducir la expresión de fibras oxidativas de contracción lenta en un músculo glicolítico de contracción rápida. Si estos resultados se corroboran más adelante, todo apuntaría a que la administración de Epicatequina no solamente puede estimular un cambio de metabolismo si no también el recambio de fibras musculares. Se ha planteado que el metabolismo de esta catequina tanto en modelos murinos como en humanos es a través del tracto gastrointestinal. La recuperación combinada de Epicatequina en la orina y las heces representa el  $95 \pm 1\%$  de la ingesta, de la cual el 78% se absorbe en el tracto gastrointestinal y luego se elimina rápidamente del sistema circulatorio a través de los riñones [89]. Esta catequina es estable durante el tránsito gástrico cuando se toma por vía oral. Después de la absorción intestinal, la mayoría de las epicatequinas se metabolizan rápidamente por las células intestinales y los hepatocitos, lo que da como resultado una acidificación glucurónica y una metilación parcial [90, 91]. Los ensayos clínicos han demostrado que la vida media y el metabolismo de la Epicatequina es muy heterogénea en diferentes individuos, y la biodisponibilidad es menor que la de la vitamina C y la

vitamina E [92, 93]. El mecanismo del metabolismo de la Epicatequina *in vivo* es complejo e involucra no solo los propios mecanismos metabólicos del cuerpo, sino también el metabolismo de los microorganismos intestinales [94]. El análisis de los mecanismos metabólicos será el método principal para estudiar la base de la biodisponibilidad de la Epicatequina así como sus desconocidos mecanismos. Al tomar en cuenta estos datos, se puede sugerir que el metabolismo de la Epicatequina podría influir en la diferencia de efectos observados *in vitro* vs. *in vivo* en este trabajo.

Los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* han confirmado que la Epicatequina tiene efectos positivos sobre células musculares C2C12 y sobre el músculo esquelético de ratón. Por lo tanto, estos resultados sugieren que este compuesto puede aumentar la fuerza muscular y retrasar la aparición de la atrofia muscular causada por el envejecimiento y las enfermedades relacionadas al músculo esquelético. Aunque los mecanismos a través de los cuales esta catequina causa estos efectos en el músculo esquelético no se han aclarado por completo, se puede concluir una vez más que la Epicatequina podría fungir como un suplemento nutricional dietéticos prometedor para mantener la homeostasis muscular y combatir la atrofia muscular por desuso. Se podría desarrollar su uso con el fin de prevenir, reducir, retrasar e incluso tratar los trastornos relacionados con el músculo esquelético causados por el envejecimiento y las enfermedades en humanos y animales mediante la suplementación de este compuesto en la dieta.

## 10. Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras se plantea aumentar el tamaño de grupo de ratones, así como de experimentos y repeticiones para obtener resultados estadísticamente significativos. Así mismo, se sugiere realizar inmunofluorescencias a cultivos C2C12 tratados con Epicatequina o DMSO [20 $\mu$ M] con anticuerpos específicos a MyHCI y MyHCIIB para obtener datos como el índice de fusión. Estas inmunofluorescencias también podrían emplearse para contar la cantidad de núcleos en una fibra para complementar los resultados positivos de la Epicatequina en la eficiencia de la diferenciación que se elucidaron en este trabajo. Posteriormente se podrían confirmar los datos de las inmunofluorescencias en secciones de tejido Soleus y EDL. De igual manera se podría determinar el efecto del tratamiento en la expresión relativa del factor regulación miogénico MYOD en un sistema *in vitro* e *in vivo*

## 11. Conclusiones

En este trabajo se comprobó que la Epicatequina en una concentración de [20µM] aumenta la proliferación de las células C2C12 de manera significativa. Además, se determinó que la Epicatequina tiene un efecto positivo en la eficiencia de la diferenciación de células C2C12. A nivel morfológico aumentó el número y el área de miotubos. A nivel de marcadores moleculares, incrementó la expresión relativa de MYOG a las 72h. En el caso de los genes específicos de miosinas, este compuesto indujo la expresión relativa de MYH7 (MyHCI o tipo I) y MYH4 (MyHCIIB o tipo IIB) en cultivos C2C12 a las 72h de diferenciación. Se necesitarán más repeticiones de estos experimentos para corroborar este efecto. En el caso de tejidos, la administración de Epicatequina vía oral en una concentración de [1mg/kg] incrementó la expresión relativa de MYOG MYH7 en los músculos Soleus y EDL. También aumentó la expresión de MYH7 en Soleus y no cambió la expresión de MYH4 ni en Soleus ni en EDL. Incrementó notoriamente la expresión relativa de MYH7 (MyHCI o tipo I) en EDL. Esto sugiere que EC favorece la expresión de fibras de contracción lenta en un músculo de contracción rápida y probablemente tiene el potencial para cambiar un metabolismo glicolítico a oxidativo. El metabolismo de la EC podría influir en la diferencia de efectos observados *in vitro* vs. *in vivo*.

## 12. Referencias

1. Yucel N, Blau Hm. Skeletal Muscle stem cell. En: Principles of regenerative Medicine. 3a edition. 2019.
2. Velthoven CTJ, Rando TA. Stem cell quiescence: dynamism, restraint, and cellular idling. Cell Stem Cell Review 2019; 24: 213-225.
3. Seale, P. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. Cell 2000; 102: 777–786.
4. Rando T A, Blau H M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell mediated gene therapy. J Cell Biol 1994; 125:1275–1287.
5. Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S. W., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., Buckingham, M. E., Partridge, T. A. and Zammit, P. S. (2000). Expression of Cd34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. J. Cell Biol. 151, 1221-1234.
6. Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A. and Morgan, J. E. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral
7. heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. Cell 122, 289-301.
8. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. and Rudnicki, M. A. (2007). Asymmetric selfrenewal and commitment of satellite stem cells in muscle. Cell 129, 999-1010.
9. Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M. A. and Tajbakhsh, S. (2012). A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. Cell 148, 112-125.
10. Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S. and Blau, H. M. (2008). Selfrenewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. Nature 456, 502-506.
11. Bishop, C., & Hall, B. (2019). *Deferring Development: Setting Aside Cells for Future Use in Development and Evolution* (20th ed., chapter 8). CRC Press.

12. Dumont, N., Wang, Y., & Rudnicki, M. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*, 142(9), 1572-1581. doi: 10.1242/dev.114223
13. M. Buckingham, P.W.J. Rigby, Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis, *Dev. Cell* 28 (February (3)) (2014)225–238.
14. Bishop, C., & Hall, B. (2019). *Deferring Development: Setting Aside Cells for Future Use in Development and Evolution* (20th ed., chapter 8). CRC Press.
15. Von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:16474–16479.
16. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000;102:777–786.
17. Olguin, H. C. et al. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J. Cell Biol.* 2007; 177: 769–779.
18. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. 1960. *J. Physiol.* 150:407–39.
19. Williams RS, Neuffer PD. 1996. In the *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*, ed. LB Rowell, JT Shepherd, pp. 1124–50. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc.
20. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech.* 2000 Sep 15;50(6):500-9. doi: 10.1002/1097-0029. PMID: 10998639.
21. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* 1996 Apr;76(2):371-423. doi: 10.1152/physrev.1996.76.2.371. PMID: 8618961.
22. Schiaffino, S., Sandri, M., & Murgia, M. (2007). Activity-Dependent Signaling Pathways Controlling Muscle Diversity and Plasticity. *Physiology*, 22(4), 269–278. doi:10.1152/physiol.00009.2007
23. Talbot, J., & Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and

- resistance to muscle disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 5(4), 518–534. <https://doi.org/10.1002/wdev.230>.
24. Augusto, V., C. Padovani, Gerson Eduardo and Rocha Campos. “Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice.” (2004). *Materials Science*
  25. Wang YX, Rudnicki MA. Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Dec 21;13(2):127-33. doi: 10.1038/nrm3265. PMID: 22186952.
  26. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000;102:777–786.
  27. Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J, Pasut A, Bentzinger CF, Brun CE, Rudnicki MA. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med*. 2015 Dec;21(12):1455-63. doi: 10.1038/nm.3990. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26569381; PMCID: PMC4839960.
  28. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet*. 2002 Feb 23;359(9307):687-95. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7. PMID: 11879882.
  29. Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1988 Feb 26;52(4):503-13. doi: 10.1016/0092-8674(88)90463-1. PMID: 3342447.
  30. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*. 2015 Mar;96(3):183-95. doi: 10.1007/s00223-014-9915-y. Epub 2014 Oct 8. PMID: 25294644.
  31. Marzetti E, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia, and frailty at old age. *Exp Gerontol* 2006; 41:1234–8.
  32. Eldadah BA. Fatigue and fatigability in older adults. *PM R*. 2010 May;2(5):406-13. doi: 10.1016/j.pmrj.2010.03.022. PMID: 20656622.
  33. Krook A, Björnholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000 Feb;49(2):284-92. doi: 10.2337/diabetes.49.2.284. PMID: 10868945.

34. Ryder JW, Yang J, Galuska D, Rinco´ n J, Bjo´ rnholm M, Krook A, et al. Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49: 647-54.
35. Hickey MS, Carey JO, Azevedo JL, Houmard JA, Pories WJ, Israel RG, Dohm GL. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol.* 1995;268:E453–457.
36. Song XM, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes* 48: 664 – 670, 1999.
37. Hickey MS, Carey JO, Azevedo JL, Houmard JA, Pories WJ, Israel RG, Dohm GL. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol.* 1995;268:E453–457.
38. Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PR, Swanson MS, Houmard JA. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E1191–1196.
39. Zheng LT, Ryu GM, Kwon BM, Lee WH, Suk K. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: inhibition of microglial neurotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jun 24;588(1):106-13. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.04.035. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18499097.
40. Ramirez-Sanchez I, Taub PR, Ciaraldi TP, Nogueira L, Coe T, Perkins G, Hogan M, Maisel AS, Henry RR, Ceballos G et al. (2013) (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *Int J Cardiol* 168, 3982–3990.
41. Augustin, S., I. T. Johnson, and S. Mike. 2005. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (1 Suppl):215S. doi: 10.1079/PHN2004668.

42. Shay, J., H. A. Elbaz, I. Lee, S. P. Zielske, M. H. Malek, and M. Huttemann. 2015. Molecular mechanisms and therapeutic effects of  $\epsilon$  (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015:1–13. doi: 10.1155/2015/181260.
43. Fraga, C. G. 2007. Plant polyphenols: How to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *Life* 59 (4):308–15. doi: 10.1080/15216540701230529
44. Aron, P. M., and J. A. Kennedy. 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (1): 79–104. doi: 10.1002/mnfr.200700137
45. Actis-Goretta, L., A. Leveques, F. Giuffrida, F. Romanov-Michailidis, F. Viton, D. Barron, M. Duenas-Paton, S. Gonzalez-Manzano, C. Santos-Buelga, G. Williamson, et al. 2012. Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine* 53 (4):787–95. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.023.
46. Kosinska, A., and W. Andlauer. 2012. Cocoa polyphenols are absorbed in Caco-2 cell model of intestinal epithelium. *Food Chemistry* 135 (3):999–1005. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.101
47. Serra, A., A. Macia, M. P. Romero, N. Angles, J. R. Morello, and M. J. Motilva. 2011. Distribution of procyanidins and their metabolites in rat plasma and tissues after an acute intake of hazelnut extract. *Food & Function* 2 (9):562–8. doi: 10.1039/c1fo10083a.
48. Mohsen, M. M. A. E., G. Kuhnle, A. R. Rechner, H. Schroeter, S. Rose, P. Jenner, and C. A. Rice-Evans. 2002. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (12):1693–702. doi: 10.1016/S0891- 5849(02)01137-1.
49. Prakash, M., Basavaraj, B. V., & Chidambara Murthy, K. N. (2019). Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. *Journal of Functional Foods*, 52, 14–24. doi:10.1016/j.jff.2018.10.021

50. Moreno-Ulloa A, Miranda-Cervantes A, Licea-Navarro A, Mansour C, Beltrán-Partida E, Donis-Maturano L, Delgado De la Herrán HC, Villarreal F, Álvarez-Delgado C. (-)-Epicatechin stimulates mitochondrial biogenesis and cell growth in C2C12 myotubes via the G-protein coupled estrogen receptor. *Eur J Pharmacol.* 2018 Mar 5;822:95-107. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.01.014. Epub 2018 Jan 20. PMID: 29355558; PMCID: PMC5809192.
51. Peluso, I., and M. Serafini. 2017. Antioxidants from black and green tea: From dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 174 (11):1195–208. doi: 10.1111/bph.13649.
52. Li P, Liu A, Liu C, Qu Z, Xiao W, Huang J, Liu Z, Zhang S. Role and mechanism of catechin in skeletal muscle cell differentiation. *J Nutr Biochem.* 2019 Dec;74:108225. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108225. Epub 2019 Aug 15. PMID: 31629963.
53. Gutierrez-Salmean, G., T. P. Ciaraldi, L. Nogueira, J. Barboza, P. R. Taub, M. C. Hogan, R. R. Henry, E. Meaney, F. Villarreal, G. Ceballos, et al. 2014. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (1):91–4. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.007.
54. Li, P., A. Liu, C. Liu, Z. Qu, W. Xiao, J. Huang, Z. Liu, and S. Zhang. 2019. Role and mechanism of catechin in skeletal muscle cell differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 74:108225. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108225.
55. Rebbapragada, A., H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste, and L. Attisano. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 23 (20):7230–42. doi: 10.1128/MCB.23.20.7230-7242.2003.
56. Gutierrez-Salmean, G., T. P. Ciaraldi, L. Nogueira, J. Barboza, P. R. Taub, M. C. Hogan, R. R. Henry, E. Meaney, F. Villarreal, G. Ceballos, et al. 2014. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth

- and differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (1):91–4. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.007.
57. McDonald, C., E. Henricson, B. Oskarsson, C. Aguilar, A. Nicorici, N. Joyce, D. Reddy, A. Wagner, E. deBie, E. Goude, et al. 2015. Epicatechin enhances mitochondrial biogenesis, increases dystrophin and utrophin, increases follistatin while decreasing myostatin, and improves skeletal muscle exercise response in adults with Becker muscular dystrophy (BMD). *Neuromuscular Disorders* 25:S314–S315. doi: 10.1016/j.nmd.2015.06.456.
58. Huttemann, M., I. Lee, G. A. Perkins, S. L. Britton, L. G. Koch, and M. H. Malek. 2013. (-) Epicatechin is associated with increased angiogenic and mitochondrial signalling in the hindlimb of rats selectively bred for innate low running capacity. *Clinical Science* 124 (11):663–74. doi: 10.1042/CS20120469
59. Shay, J., H. A. Elbaz, I. Lee, S. P. Zielske, M. H. Malek, and M. Huttemann. 2015. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015:1–13. doi: 10.1155/2015/181260.
60. Buitrago-Lopez A, Sanderson J, Johnson L, Warnakula S, Wood A, Di Angelantonio E et al. Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis *BMJ* 2011; 343 :d4488 doi:10.1136/bmj.d4488.
61. Taub P, Ramirez-Sanchez I, Ciaraldi T, et al. Alterations in skeletal muscle indicators of mitochondrial structure and biogenesis in patients with type 2 diabetes and heart failure: Effects of epicatechin rich cocoa. *Clin Trans Sci* 2012;5: 43–7.
62. Ramirez-Sanchez I, Taub PR, Ciaraldi TP, Nogueira L, Coe T, Perkins G, Hogan M, Maisel AS, Henry RR, Ceballos G et al. (2013) (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *Int J Cardiol* 168, 3982–3990.

63. Nogueira L, Ramirez-Sanchez I, Perkins GA, Murphy A, Taub PR, Ceballos G, Villarreal FJ, Hogan MC, Malek MH. (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J Physiol*. 2011 Sep 15;589(Pt 18):4615-31. doi: 10.1113/jphysiol.2011.209924. Epub 2011 Jul 25. PMID: 21788351; PMCID: PMC3208228.
64. De los Santos, S., Reyes-Castro, L., Coral-Vázquez, R., Méndez, J., Leal-García, M., Zambrano, E., & Canto, P. (2020). (-)-Epicatechin reduces adiposity in male offspring of obese rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11(1), 37-43. doi:10.1017/S2040174419000345.
65. De los Santos, S., Coral-Vázquez, R. M., Menjivar, M., Granados-Silvestre, M. de los Á., Tejeda, M. E., Reyes-Castro, L. A., Canto, P. (2019). (-)-Epicatechin modifies body composition of the male offspring of obese rats. *Journal of Functional Foods*, 58, 367–373. doi:10.1016/j.jff.2019.05.014
66. De Los Santos, S., Palma-Flores, C., Zentella-Dehesa, A., Canto, P. & Coral-Vázquez, R. 659 M. (-)-Epicatechin inhibits development of dilated cardiomyopathy in  $\delta$  sarcoglycan null 660 mouse. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 28, 1188–1195 (2018).
67. Cremonini E, Fraga CG, Oteiza PI. (-)-Epicatechin in the control of glucose homeostasis: Involvement of redox-regulated mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2019 Jan;130:478-488. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.010. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30447350.
68. Nogueira L, Ramirez-Sanchez I, Perkins GA, Murphy A, Taub PR, Ceballos G, Villarreal FJ, Hogan MC, Malek MH. (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J Physiol*. 2011 Sep 15;589(Pt 18):4615-31. doi: 10.1113/jphysiol.2011.209924. Epub 2011 Jul 25. PMID: 21788351; PMCID: PMC3208228.
69. Ramirez-Sanchez I, Nogueira L, Moreno A, Murphy A, Taub P, Perkins G, Ceballos GM, Hogan M, Malek M, Villarreal F. Stimulatory effects of the flavanol (-)-epicatechin on cardiac angiogenesis: additive effects with exercise. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012 Nov;60(5):429-38. doi: 10.1097/FJC.0b013e318269ae0d. PMID: 22833114; PMCID: PMC3496054.

70. Ramirez-Sanchez, I., De los Santos, S., Gonzalez-Basurto, S., Canto, P., Mendoza-Lorenzo, P., & Palma-Flores, C. et al. (2014). (-)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic  $\delta$ -sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS Journal*, 281(24), 5567-5580. doi: 10.1111/febs.13098
71. Gutierrez-Salmean, G., Ciaraldi, T., Nogueira, L., Barboza, J., Taub, P., & Hogan, M. et al. (2014). Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 91-94. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.007
72. Giudice, J., & Taylor, J. M. (2017). Muscle as a paracrine and endocrine organ. *Current opinion in pharmacology*, 34, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.05.005>
73. Iizuka K, Machida T, Hirafuji M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci*. 2014;125(2):125-31. doi: 10.1254/jphs.14r02cp. Epub 2014 May 23. PMID: 24859778.
74. Karsenty, G., & Olson, E. N. (2016). Bone and Muscle Endocrine Functions: Unexpected Paradigms of Inter-organ Communication. *Cell*, 164(6), 1248–1256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.043>
75. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int*. 2015; 96(3):183- 95. DOI: 10.1007/s00223-014-9915-y.
76. Bishop, C., & Hall, B. (2019). *Deferring Development: Setting Aside Cells for Future Use in Development and Evolution* (20th ed., chapter 8). CRC Press.
77. Talbot, J., & Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 5(4), 518-534. doi: 10.1002/wdev.230
78. Bassel-Duby, R., & Olson, E. (2006). Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annual Review Of Biochemistry*, 75(1), 19-37. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142622

79. Brun, C. E., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2017). Single EDL Myofiber Isolation for Analyses of Quiescent and Activated Muscle Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 149–159. doi:10.1007/978-1-4939-7371-2\_11.
80. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
81. H. J. Motulsky, GraphPad Statistics Guide.
82. Rebbapragada, A., H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste, and L. Attisano. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 23 (20):7230–7242. doi: 10.1128/MCB.23.20.7230-7242.2003.
83. Langley, B., M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, and R. Kambadur. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51):49831–49840. doi: 10.1074/jbc.M204291200.
84. Gutierrez-Salmean, G., T. P. Ciaraldi, L. Nogueira, J. Barboza, P. R. Taub, M. C. Hogan, R. R. Henry, E. Meaney, F. Villarreal, G. Ceballos, and I. Ramirez-Sanchez. 2014. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (1):91–94. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.007.
85. McDonald, C., E. Henricson, B. Oskarsson, C. Aguilar, A. Nicorici, N. Joyce, D. Reddy, A. Wagner, E. deBie, E. Goude, et al. 2015. Epicatechin enhances mitochondrial biogenesis, increases dystrophin and utrophin, increases follistatin while decreasing myostatin, and improves skeletal muscle exercise response in adults with Becker muscular dystrophy (BMD). *Neuromuscular Disorders* 25:S314–S315. doi: 10.1016/j.nmd.2015.06.456.
86. Huttemann, M., I. Lee, G. A. Perkins, S. L. Britton, L. G. Koch, and M. H. Malek. 2013. (-) Epicatechin is associated with increased angiogenic and mitochondrial signalling in the hindlimb of rats selectively bred for innate low

- running capacity. *Clinical Science* 124 (11):663–74. doi: 10.1042/CS20120469
87. Gutierrez-Salmean, G., T. P. Ciaraldi, L. Nogueira, J. Barboza, P. R. Taub, M. C. Hogan, R. R. Henry, E. Meaney, F. Villarreal, G. Ceballos, and I. Ramirez-Sanchez. 2014. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (1):91–94. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.007.
88. Lee, S. J., Y. E. Leem, G. Y. Go, Y. Choi, Y. J. Song, I. Kim, D. Y. Kim, Y. K. Kim, D. W. Seo, J. S. Kang, and G. U. Bae. 2017. Epicatechin elicits MyoD-dependent myoblast differentiation and myogenic conversion of fibroblasts. *PLoS One* 12 (4):e0175271. doi: 10.1371/journal.pone.0175271.
- 89.<sup>1</sup> Kim, A. R., K. M. Kim, M. R. Byun, J. H. Hwang, J. I. Park, H. T. Oh, H. K. Kim, M. G. Jeong, E. S. Hwang, and J. H. Hong. 2017. Catechins activate muscle stem cells by Myf5 induction and stimulate muscle regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 489 (2):142–148. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.114.
- 90.<sup>1</sup> Ottaviani, J. I., G. Borges, T. Y. Momma, J. P. E. Spencer, C. L. Keen, A. Crozier, and H. Schroeter. 2016. The metabolome of [2-14C]epicatechin in humans: Implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Scientific Reports* 6 (1):29034. doi: 10.1038/srep29034.
91. Peluso, I., and M. Serafini. 2017. Antioxidants from black and green tea: From dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 174 (11):1195–208. doi: 10.1111/bph.13649.
92. Actis-Goretta, L., A. Leveques, F. Giuffrida, F. Romanov-Michailidis, F. Viton, D. Barron, M. Duenas-Paton, S. Gonzalez Manzano, C. Santos-Buelga, G. Williamson, et al. 2012. Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine* 53 (4):787–95. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.023.

93. Khymenets, O., M. Rabassa, M. Rodriguez-Palmero, M. Rivero-Urgell, M. Urpi-Sarda, S. Tulipani, P. Brandi, C. Campoy, C. Santos-Buelga, and C. Andres-Lacueva. 2016. Dietary epicatechin is available to breastfed infants through human breast milk in the form of host and microbial metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (26):5354–60. doi:10.1021/acs.jafc.6b01947.
94. Rein, D., S. Lotito, R. R. Holt, C. L. Keen, H. H. Schmitz, C. G. Fraga, J. W. Erdman Jr., J. Wills, and D. Finley. 2000. Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of Nutrition* 130 (8):2109S–14S. doi: 10.1046/j.1365-277x.2000.00245.x.
95. Uhlenhuth, K., and P. Högger. 2012. Facilitated cellular uptake and suppression of inducible nitric oxide synthase by a metabolite of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radical Biology and Medicine* 15 (2):53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.013.

## 11. Anexos

**Tabla 2. Lista de primers.**

Primers		Secuencia
mRps18	Forward	AACGGTCTAGACAACAAGCTG
	Reverse	AGTGGTCTTGGTGTGCTGAC
Myog	Forward	CAGTGAATGCAACTCCCACA
	Reverse	GAGCAAATGATCTCCTGGGTT
MyHCI	Forward	ACCTACTCGGGCCTCTTCTGC
	Reverse	AGGGGCCTCGCTCCTCTTCTT
MyhIIb	Forward	TCAATGAGATGGAGATCCAGCTGAAC
	Reverse	GTCCAGGTGCAGCTGTGTGTCCTTC