



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Identificación y caracterización de nuevos inhibidores de la función
de la miostatina en el músculo esquelético de ratón a partir de
modelaje molecular”**

TESIS

Que presenta:

QFB. KEVIN RUIZ FAJARDO.

Para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS.

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Director de tesis:

DR. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ

Ciudad de México

agosto 2021

Resumen

La homeostasis del músculo esquelético condiciona múltiples aspectos del funcionamiento del organismo, adicionalmente, el músculo esquelético adulto es uno de los tejidos con mayor capacidad de regeneración en respuesta al daño físico o bajo contextos de enfermedad. Esta característica depende de la funcionalidad de células madre músculo-específicas denominadas células satélite, las cuales obedecen a una serie de eventos moleculares que dictan el programa de activación y diferenciación del músculo en regeneración. A nivel molecular, distintas redes de regulación transcripcional controlan jerárquicamente el desarrollo y la diferenciación muscular. La expresión de genes de diferenciación (MRFs) como Myf5 y MyoD aseguran el compromiso miogénico y dirigen el programa irreversible de diferenciación de mioblastos. Por otro lado, la Miostatina (GDF-8).se expresa en altos niveles en mioblastos y fibras del músculo rápido, esto sugiere un rol inhibitorio de la Miostatina (Mstn) en el programa de diferenciación muscular.

La Mstn actúa canónicamente a través del receptor de activina (ActRIIB) para regular negativamente la expresión de MRFs, así mismo juega un papel importante en la especificación de los tipos de miofibras durante la diferenciación miogénica. En esfuerzos por bloquear esta vía de regulación se realizó la identificación de nuevos inhibidores de la función de la Mstn en el músculo esquelético de ratón a partir de modelaje molecular capaces de bloquear la cascada de señalización de la Mstn.

En estudios previos se identificó a la molécula (NUCC-555) con capacidad de unión inhibitoria a Activina, y se reportó que dicha molécula lograba unirse de manera secundaria y con menos afinidad a Mstn. Con base en esto, en el presente trabajo se realizó un análisis *in-silico* para encontrar compuestos química y estructuralmente similares a NUCC-555 para posteriormente mediante *Docking Molecular* determinar el sitio de unión a Mstn. Finalmente, mediante un análisis *in-vitro* se evaluó su efecto sobre la proliferación y la diferenciación de células derivadas de musculo esquelético de ratón, C2C12.

Abstract

Skeletal muscle homeostasis conditions multiple aspects of the organism's functioning, additionally, adult skeletal muscle is one of the tissues with the greatest capacity for regeneration in response to physical damage or under the context of disease. This characteristic depends on the functionality of muscle-specific stem cells called satellite cells, which obey a series of molecular events that dictate the activation and differentiation program of the regenerating muscle. At the molecular level, different transcriptional regulatory networks hierarchically control muscle development and differentiation. The expression of differentiation genes (MRFs) such as Myf5 and MyoD ensure myogenic compromise and direct the irreversible program of myoblast differentiation. On the other hand, Myostatin (GDF-8) is expressed at high levels in myoblasts and fast muscle fibers, this suggests an inhibitory role of Myostatin (Mstn) in the muscle differentiation program.

Mstn acts canonically through the activin receptor (ActRIIB) to negatively regulate the expression of MRFs, it also plays an important role in the specification of myofiber types during myogenic differentiation; In efforts to block this regulatory pathway, the identification of new inhibitors of Mstn function in mouse skeletal muscle will be carried out based on molecular modeling capable of blocking the Mstn signaling cascade.

Previous studies have identified a molecule (NUCC-555) that maintained an inhibitory binding to Activin, and was reported that said molecule managed to bind secondarily and with less affinity to Mstn. Based on this, an *in-silico* analysis was carried out to find compounds that were chemically and structurally similar to NUCC-555, and subsequently, by means of *Molecular Docking*, the binding site to Mstn was determined. Finally, an *in-vitro* analysis evaluated its effect on proliferation and differentiation, observing an increase of molecular and morphological signatures of muscle differentiation, in cells derived from mouse skeletal muscle, C2C12.

Dedicatoria

A mi creador

A mis padres y mi familia

A mi compañera de vida

Al acervo científico

A mi país

“Un científico en su laboratorio no solo es un técnico, también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”

Marie Salomea Sklodowska Curie (1867-1934)

Agradecimientos

Este proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio 19 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco CDMX. y fue posible gracias al financiamiento otorgado por CONACYT.

Agradezco al Dr. José Manuel Hernández Hernández por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por su apoyo incondicional para llevar a cabo el proyecto, por los consejos, las recomendaciones y la guía en el camino, y por aceptar y apoyar mis ideas y proyectos para crecimiento profesional. Gracias por su ayuda, sus consejos, su enseñanza y la confianza brindada a lo largo de este proyecto.

También quisiera agradecer a mis asesores el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y al Dr. Oscar Hernández Hernández por su ayuda a lo largo de este camino, por sus consejos observaciones y por alentarme a mejorar continuamente. De igual Forma al Dr. Juan Fernando Villa Díaz de León por la revisión de formato y texto, así como los consejos y técnicas de escritura.

Agradezco por ultimo y no menos importante a mis padres el LAE. Josué Ruiz González y la Lic. Olga Lidia Fajardo Campos por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida tanto personalmente como profesionalmente, por su amor, su comprensión, su disciplina su ejemplo, esfuerzo y entrega; de igual forma agradezco a mis hermanos Daniel Ruiz Fajardo y Josué Ruiz Fajardo por estar siempre presentes ante cualquier necesidad que pude requerir; así mismo a mi compañera de vida la QFB. Alicia Maldonado Rojas por su apoyo y sobre todo el ánimo incondicional que me brinda a lo largo de todo este camino recorrido.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. El músculo esquelético.....	12
2. Células satélite.....	13
3. Factores reguladores miogénicos.....	14
4. Mecanismos de regulación de la diferenciación muscular.....	15
5. Los TGF- β como reguladores de la diferenciación	16
6. La miostatina.....	18
7. Función de la miostatina e importancia como candidato terapéutico.....	19
ANTECEDENTES.....	24
8. Estrategias de inhibición de la miostatina.....	24
9. Métodos de modelaje molecular	25
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS.....	29
10. Objetivo general.....	29
11. Objetivos específicos.....	29
HIPOTESIS	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
METODOLOGÍA.....	32
12. Metodología para el modelaje molecular	32
13. Metodología para el análisis <i>in-vitro</i>	33
14. Metodología para la caracterización de la diferenciación por RT-qPCR.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
15. Modelaje molecular de posibles inhibidores de la función de la miostatina en el músculo esquelético.....	34
16. Análisis de toxicidad	37
17. Cultivo celular.....	37
18. Caracterización de la eficiencia de diferenciación muscular.	37
19. Cuantificación del área de miotubos por Fiji	40
20. Análisis Estadístico.....	41
RESULTADOS.....	42

21. Modelaje molecular de posibles inhibidores de la función de la miostatina en el músculo esquelético.....	42
1.a Proteína Miostatina como blanco de inhibición	42
1.b Determinación de las moléculas candidatas para el análisis de similitud química.	42
1.c Determinación de la similitud química.	44
1.d Determinación de la probabilidad de unión con Mstn.	46
1.e Determinación de la estabilidad de unión del complejo Mstn-Ligando	48
22. Análisis del efecto del “Lig 1 “sobre la diferenciación de las células C2C12.....	51
2.a Análisis de la toxicidad celular del Ligando 1	51
2.b Cultivo, diferenciación y tratamiento de células C2C12 (Mioblastos) con “Ligando 1”	52
2.c Determinación de cambios en la diferenciación de células C2C12, a nivel morfológico en presencia del Ligando 1	55
23. Análisis del efecto del Ligando 1 sobre la expresión de marcadores de la diferenciación muscular.....	57
DISCUSION DE RESULTADOS	62
PERSPECTIVAS FUTURAS	67
CONCLUSIONES.....	68
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABF	Adaptative Biasing Force
ActRIIA	Activin Receptor Type IIA
ActRIIB	Activin Receptor Type IIB
ALK-4	Activin Like Kinase-4
ALK-5	Activin Like Kinase-5
ATP	Adenosine Triphosphate
BFEE	Binding Free Energy Estimator

bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
CS	Células Satélite
DFT	Teoría de los Funcionales de la Densidad
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FOXO	Forkhead family transcription Factors O subclass
FSH β	Follicle Stimulating Hormone Beta Subunit
GDFs	Growth Differentiation Factors
GDF-8	Growth Differentiation Factor-8
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
IGF-1	Insulin Like Growing Factor-1
LAP	Latency Associated Propeptide
Lig 1	Ligando 1
LUMO	Lowest Occupied Molecular Orbital
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MD	Molecular Dynamics
MHCI	Myosin Heavy Chain I
MHCIIB	Myosin Heavy Chain IIB
MRFs	Myogenic Regulatory Factors
Mrf4	Myogenic Regulatory Factor-4
Mstn	Miostatina
MuRF1	Muscle RING-Finger Protein-1
MyoD	Myoblast Determination Protein 1
MyoG	Miogenina

NAMD	Nanoscale Molecular Dynamics
Pax7	Factor de transcripción miogénico, (+) presencia, (-) ausencia
PDB	Protein Data Bank
RG	Radius of Gyration
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RNA	Ribonucleic Acid
RSP18	Ribosomal Protein S18
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SBE	Smad Binding Elements
SFB	Serum Fetal Bovine
SMAD	Small Mothers Against Decantaplegic
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta Superfamily
UPS	Sistema Ubiquitina Proteasoma
VMD	Visual Molecular Dynamics
VESTA	Visualization System for Electronic & Structural Analysis

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Esquema general de la organización de un fascículo muscular.....	12
2. Programa de diferenciación muscular, expresión de marcadores del crecimiento muscular y su tiempo de desarrollo	14
3. Representación esquemática de la topología del mecanismo de acción canónico de la subfamilia de GDFs de los TGF- β	16
4. Ratón silvestre y ratón “Knock out” a Mstn.....	17

5. Representación esquemática de los principales estadios de la acción de la Mstn a nivel celular	18
6. Estructura de la ProMiostatina, Precursor de la Mstn	19
7. Estructura de la miostatina su procesamiento proteolítico y su posterior acción en el receptor de la célula diana	20
8. Función de la Mstn a nivel molecular e importancia como candidato terapéutico	22
9. Proteína Mstn (GDF-8) cristalizada de <i>Mus musculus</i> a una resolución de 2.25Å Fuente RCSB PDB	39
10. Estrategia <i>in-silico</i> basada en identificar pequeñas moléculas antagonistas a la vía de señalización de Mstn.....	40
11. Región bisagra, dominio de unión de Mstn	40
12. Representación de la base de datos de SwissSimilarity, y la obtención de 110 moléculas más similares a Nucc-555 del total de 10,639,400 compuestos	41
13. . Representación gráfica de análisis por componente principal.....	42
14. Representación de la estructura de NUCC55 y las 9 moléculas más similares...	43
15. Dependencia del tiempo de las desviaciones cuadráticas medias (RMSD) y Evolución en el tiempo del Radio de Giro (Rg)	46
16. Energía de unión libre absoluta a Mstn verificada por triplicado para cada ligando.	46
17. Esquema representativo de las interacciones que mantienen, A) Lig 0 (NUCC-555) y B) “Lig 1” (ZINC11789796), con Mstn y con el solvente	47
18. Mioblastos C2C12 de ratón cultivados en Medio DMEM c/SFB 10% durante 48 horas con tratamiento con el “Lig 1”	48
19. Mioblastos C2C12 de ratón en confluencia del 80%, cultivados en Medio DMEM c/SFB 10%	49
20. Medición del área promedio de miotubos en cultivo a las 72 horas de diferenciación en presencia del “Lig 1” [25 µM] y DMSO [25 µM] como control.....	53
21. RNA total de células C2C12 a diferentes tiempos de diferenciación, tratadas con “Lig 1” [25 µM] y con DMSO [25 µM] como control.....	54

22. RT-PCR punto final de los genes involucrados en la diferenciación muscular a diferentes tiempos de diferenciación con Ligando 1 [25 μ M] y DMSO [25 μ M] como control	55
23. RT-qPCR de A) MyoD, B) MyoG, C) MHCI y D) MHCIIB	56
24. Perfil de expresión de fibras A) MHCI y B) MHCIIB en cultivos tratados con “Ligando 1” y DMSO como control.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Técnicas <i>in-silico</i> de modelado molecular en función del conocimiento de la estructura del ligando y el receptor.....	25
2. Primers utilizados en los análisis de RT-qPCR.....	38
3. Probabilidad de unión de las moléculas a Mstn.	45
4. Energía de unión libre absoluta a Mstn para cada ligando.	46

5. Tratamiento a diferentes concentraciones con el “Ligando 1” y “DMSO” en Mioblastos C2C12 de ratón, cultivados en medio de crecimiento DMEM c/SFB 10% respectivamente.....	51
6. Tratamiento a diferentes concentraciones con el “Ligando 1” y “DMSO” de Mioblastos C2C12 de ratón cultivados en medio de diferenciación DMEM c/SC 2% respectivamente.	51
7. Tipos de fibras y su funcionamiento en el musculo esquelético	63

INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético

El músculo esquelético comprende aproximadamente el 40–50 % del peso total del cuerpo y por masa es el tejido más grande en el cuerpo humano. La homeostasis muscular es vital en el mantenimiento del balance energético, capacidad de hacer ejercicio y función respiratoria [1] (Figura 1).

La homeostasis del músculo esquelético condiciona múltiples aspectos del funcionamiento del organismo; desde el mantenimiento postural, la transducción de fuerza y el movimiento, hasta la regulación de procesos metabólicos que permiten el mantenimiento de un estado energético adecuado. Adicionalmente, el músculo esquelético adulto es uno de los tejidos con mayor capacidad de regeneración en respuesta al daño físico o bajo contextos de enfermedad. Esta característica depende de la funcionalidad de células madre músculo-específicas denominadas células satélite, las cuales obedecen a una serie de eventos moleculares que dictan el programa de activación y diferenciación del músculo en regeneración [2].

El desgaste muscular sistémico está asociado con debilidad, fatiga, fragilidad, resistencia a la insulina, fractura de huesos, hospitalización, invalidez y muerte [3]. Con base en la elevada demanda funcional del músculo esquelético, es requerida la presencia de mecanismos de regeneración muscular. En este sentido, las células troncales del músculo esquelético, conocidas como células satélites (CS), se encargan de reparar o regenerar las fibras dañadas ante un evento de daño causado por enfermedad, ejercicio físico intenso o ciertos fármacos tóxicos para el músculo (Figura 1).

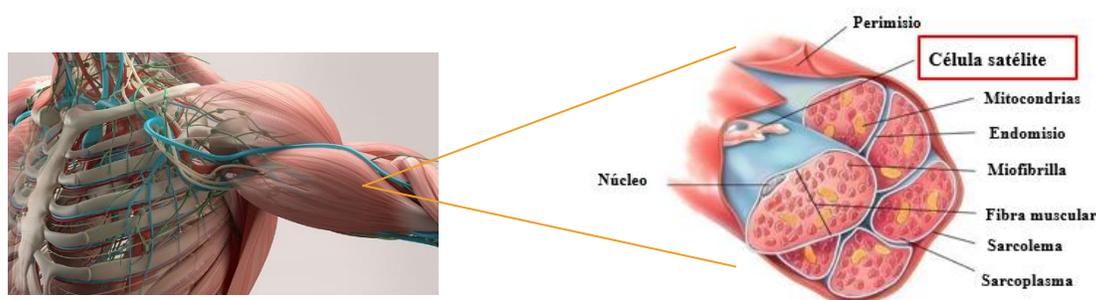


Figura 1. Esquema general de la organización de un fascículo muscular y sus componentes.

Células satélite

Las células satélite, son las células troncales de músculo esquelético y son las responsables de la reparación y de la homeostasis del músculo esquelético de un organismo adulto durante toda su vida. Las CS se localizan entre la lámina basal y las miofibras diferenciadas, dándoles la distintiva ubicación de satélite, entre la membrana celular y la lámina basal [4].

En la homeostasis y en estado de reposo las CS se encuentran en estado quiescente; con bajos niveles metabólicos y transcripcionales, cuyo marcador bioquímico es el factor de transcripción Pax7 [5]. Las CS se activan y entran al ciclo celular, para proveer los progenitores comprometidos por el daño o el estrés y originar células precursoras miogénicas (mioblastos) necesarios para la regeneración muscular y por otro lado para autorrenovarse manteniendo el reservorio de CS [6,7].

El conjunto de CS es una población heterogénea que contiene rasgos fenotípicos y funcionales distintos. Indistintamente de su estado metabólico, todas las CS expresan Pax7 como principal factor transcripcional [8]. Se ha determinado que un aproximado del 80% de las células Pax7+ son simultáneamente positivas para el factor Myf5, mientras que el 20% restante solo expresan al factor Pax7. Se ha observado que las células Pax7+/Myf5- pueden dar sucesión tanto a células Myf5+ como Myf5- a través de divisiones asimétricas. Por otro lado, las células Pax7+/Myf5+ solo pueden generar progenie de células Myf5+ a través de divisiones simétricas generadas paralelamente a la fibra muscular. Estos hallazgos sugieren que la población de células Pax7+/Myf5- funcionan como auténticas CS troncales, y las células Pax7+/Myf5+, más susceptibles a ingresar al programa de diferenciación muscular, funcionan como CS miogénicas, destinadas a la regeneración de la fibra muscular [9,10].

En general cuando las CS quiescentes son activadas en respuesta del daño muscular estas proliferan y se diferencian en nuevas fibras musculares [8].

Factores reguladores miogénicos

Los factores reguladores miogénicos (MRFs) son un grupo de proteínas músculo-específicas las cuales incluyen MyoD, Myf5, Miogenina y MRF4 que actúan a múltiples puntos en la diferenciación muscular para que cooperativamente establezcan el fenotipo de músculo esquelético a través de la regulación de la proliferación, arresto irreversible del ciclo celular de las células precursoras seguido de una activación regulada del músculo sarcomérico y de genes específicos del músculo para facilitar la diferenciación y el ensamble sarcomérico [11].

Los MRFs forman una selecta familia de factores de transcripción cuya función y actividad representan un paradigma donde una serie de eventos moleculares determinan el destino de todo un linaje celular.

Molecularmente existen distintas redes de regulación transcripcional que controlan jerárquicamente el desarrollo muscular. Primariamente Pax7 induce la expresión de Myf5 y secuencialmente éste a MyoD para dar lugar a la diferenciación inicial. La expresión de Myf5 y MyoD aseguran el compromiso miogénico y dirigen irreversiblemente el programa de diferenciación en mioblastos, los cuales proliferan originando progenitores miogénicos, en donde consecuentemente la expresión de Pax7 disminuye. Los MRFs; Miogenina (MyoG) y MRF4 finalmente inducen la expresión de genes de diferenciación terminal y de proteínas estructurales, que harán posible la fusión y la funcionalidad de la miofibra madura, Figura 2 [12].

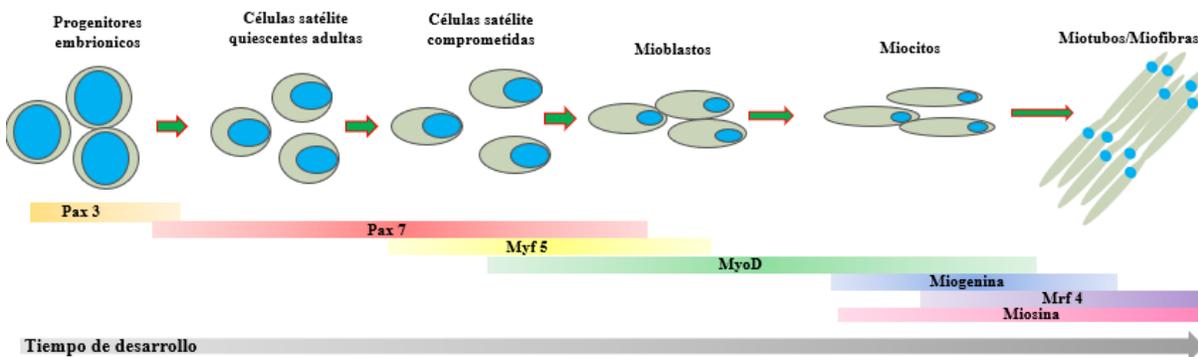


Figura 2. Programa de diferenciación muscular, expresión de marcadores del crecimiento muscular y su tiempo de desarrollo. Tomado y modificado de Olguin et al 2007.

Mecanismos de regulación de la diferenciación muscular

El programa de diferenciación muscular es mediado principalmente por los Factores Reguladores Miogénicos (MRFs), iniciando una cascada transcripcional que marca el ingreso irreversible al programa de diferenciación [13].

Adicional a estos mecanismos, se ha reportado la existencia de vías de señalización que desencadenan la inhibición del programa de diferenciación muscular. La familia del Factor

de crecimiento transformante TGF- β es un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas y entre cuyos miembros se encuentran los GDFs (Growth Differentiation Factors), BMPs (Bone Morphogenic Proteins), Activina A, entre otros. Entre todos ellos, el GDF-8 (Growth Differentiation Factor-8) también llamado miostatina, es un potente inhibidor de la diferenciación músculo esquelética: y a través de su efector principal Smad3, que regula la inhibición de la diferenciación miogénica en células C2C12 [14] (Figura 3).

Los TGF- β como reguladores de la diferenciación

Los GDFs como subfamilia de los TGF- β tienen como principal efector regulador a Smad 2/3, cuya actividad está mediada por la activación de ActRIIB. Esto resulta en la fosforilación del receptor ActRIIB en el dominio GS, lo que desencadena que Smad 2/3 forme un complejo oligomerizándose con Smad4. Finalmente, este complejo es translocado a núcleo donde se une a elementos de respuesta, específicos en las regiones promotoras de genes blanco, regulando así su transcripción [15,16] (Figura 3).

Smad 2/3 interactúa físicamente con el dominio HLH (Hélice-Asa-Hélice) de MyoD, y esta interacción, se correlaciona con la habilidad de Smad3 para interferir con la heterodimerización de la proteína MyoD/E, por consiguiente, con la unión de los complejos de MyoD en los sitios E-box. [13,14].

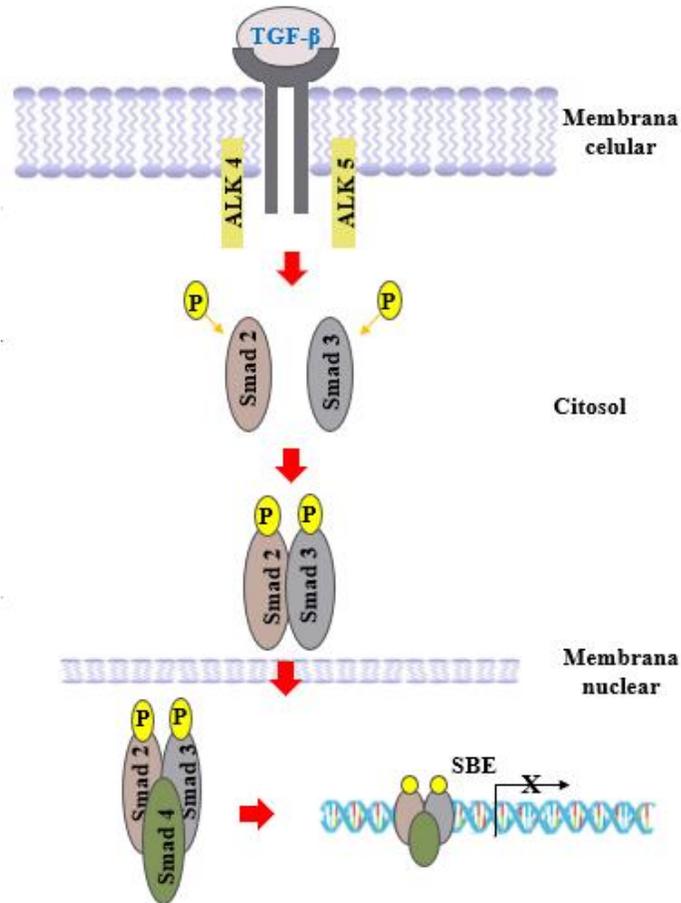


Figura 3. Representación esquemática de la topología del mecanismo de acción canónico de la Subfamilia de GDFs de los Factores de crecimiento transformantes TGF-β y su papel en la regulación de la diferenciación muscular. Tomado y modificado de Han et al., 2013.

Además, se ha visto que la expresión de Mstn juega un papel importante en el desgaste muscular en condiciones catabólicas dependiente de la expresión de dos ligasas E3, (Atrogina-1 también llamada MAFbx (Muscle Atrophy F-Box)) y MuRF1 (Muscle RING Finger Protein-1), debido a que estas enzimas reconocen proteínas músculo-específicas. [17]. Por lo tanto, hay un incremento en la expresión de Atrogina-1/MAFbx y MuRF1 en varias condiciones catabólicas incluyendo cáncer, diabetes, enfermedad renal crónica e inanición. Como consecuencia la incrementada expresión de estas ligasas, E3 es considerada sinónimo de la activación del sistema ubiquitina proteasoma (UPS) [18].

Juntos, estos resultados muestran el modelo de cómo miembros de la familia de los TGF- β regulan negativamente la diferenciación miogénica [14,17].

La capacidad de la regeneración muscular disminuye con el tiempo y a medida que el organismo se enfrenta a contextos catabólicos desfavorables. Por ello, es necesario conocer nuevos coadyuvantes que regulen el programa de diferenciación-regeneración para diseñar estrategias que permitan su manipulación con fines terapéuticos.

La miostatina

La miostatina (Mstn) forma parte de la subfamilia de los GDFs, que a su vez forma parte de la superfamilia de los Factores de crecimiento transformantes (TGF- β). Es un potente regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético en mamíferos. [19]. Fenotipos de modelos murinos nulos a Mstn son caracterizados por una extrema ganancia de masa muscular comúnmente llamada como doble musculatura [20,21] (Figura 4).

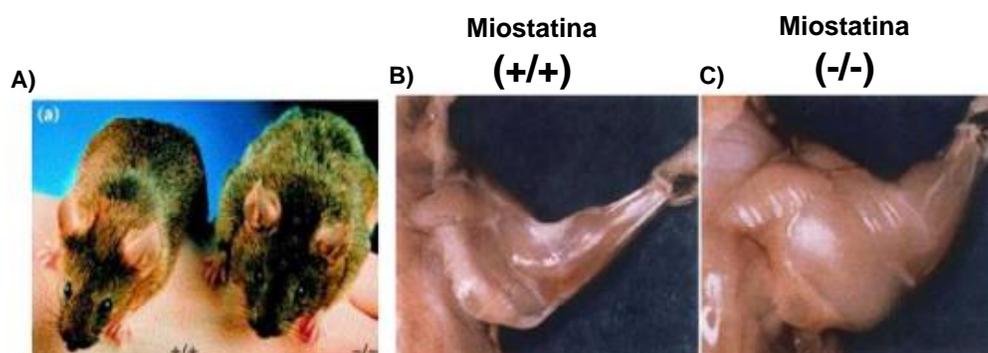


Figura 4. A) Ratón silvestre y ratón “Knock out” a Mstn. B) Fenotipo de modelo murino silvestre de lado izquierdo y C) Modelo murino nulo a Mstn de lado derecho mediante Knock-out. Tomado de McPherron y Lawer.,1997.

La Mstn está expresada predominantemente en el músculo esquelético a lo largo de la vida, desde edades tempranas de la embriogénesis hasta la edad adulta tardía. En las etapas tempranas del desarrollo, la expresión de la Mstn está restringida al desarrollo de las somitas del compartimiento del miotomo [22].

La Mstn, está también expresada en músculo cardiaco, particularmente, en las fibras de Purkinje, estructuras contráctiles y la arteria coronaria muscular, aunque los niveles son bajos en comparación con el músculo esquelético, donde se encuentra mayoritariamente [22,23,24].

La Mstn es expresada en las etapas tardías del desarrollo y en animales adultos [22]. Además, se expresa durante la proliferación y durante la diferenciación hacia miofibras, siendo este último estadio donde se aprecia su mayor efecto con incremento en el inicio de la fusión y una disminución durante la diferenciación terminal [19] (Figura 5).

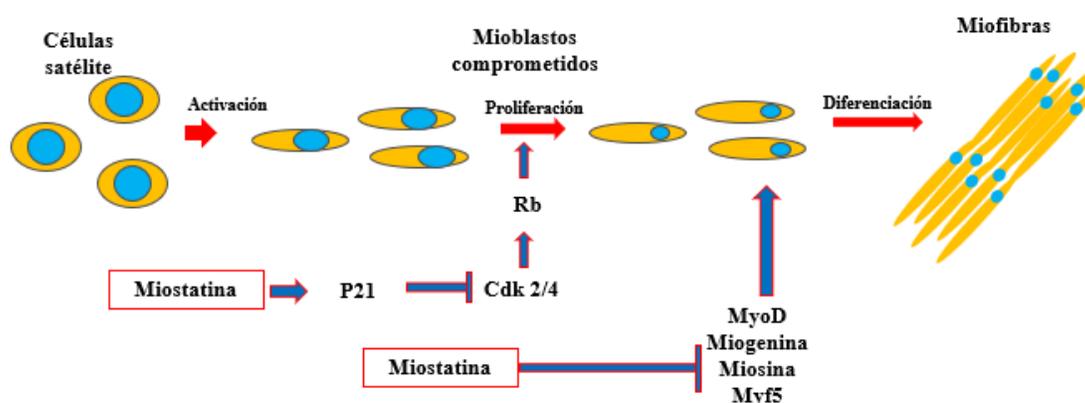


Figura 5. Representación esquemática de los principales estadios de la acción de la Mstn a nivel celular.

Tomado y modificado de Garikipati et al., 2007.

Función de la miostatina e importancia como candidato terapéutico

Actualmente, se sabe que hay una correlación positiva entre el contenido de las fibras rápidas tipo II y la abundancia del ARNm de la Mstn en varios músculos esqueléticos [25], siendo diferenciadas de las fibras lentas tipo I en su capacidad de contracción, como su nombre lo indica la primeras con funcionalidad de contracción rápida y las segundas de contracción lenta [26].

La transcripción de la Mstn es regulada en el músculo por las E-Boxes (CANNTG), Las cuales son activadas por los factores MyoD y FOXO que desencadenan en una regulación al alza de Mstn durante el ciclo celular, siendo en fase G1 su mayor actividad, que es cuando los niveles de expresión de MyoD son máximos [27,28]. Con base en la correlación positiva

que se tiene, se sabe que los músculos de contracción rápida pueden ser más sensibles que los músculos de contracción lenta para cambiar la expresión de la Mstn [29].

La disponibilidad de la Mstn (péptido COOH-Terminal) bioactiva es firmemente regulado a través del secuestro proteico por su propio precursor ProMiostatina (péptido NH₂-Terminal-COOH-Terminal), también denominado LAP (Péptido Latente Asociado), (Figura 6). La Mstn es sintetizada en el miocito como una preproteína que, tras un proceso de proteólisis, es dividida en 2 péptidos: el propéptido NH₂-terminal de 26 kD y un péptido maduro COOH-terminal de 12,5 kD [30]. La Mstn madura es liberada directamente al suero manteniéndose unida de forma no covalente al propéptido, formando el LAP, que este representa el 70% de la Mstn circulante (Figura 7).

Además del propéptido, Folistatina una glucoproteína rica en cisteína e inhibidora de algunos miembros de la familia de los TGF β es capaz de unirse al péptido maduro y formar también el LAP, Una vez en el lugar de acción, el LAP se ve sometido, a un proceso de proteólisis por metaloproteasas y serinproteasas, en el que se obtienen, por un lado, el propéptido NH₂-terminal o Folistatina, y por otro, la Mstn en su forma activa que actúa sobre su receptor. [30,31] (Figura 7).



Figura 6. Estructura de la ProMiostatina, Precursor de la Mstn. En verde se encuentra el primer monómero COOH-Terminal de Mstn y en Naranja el segundo monómero COOH-Terminal, las hojas β -plegadas de la parte inferior son el propéptido NH_2 -terminal, todo en conjunto se denomina complejo LAP. Tomada del Protein Data Bank.

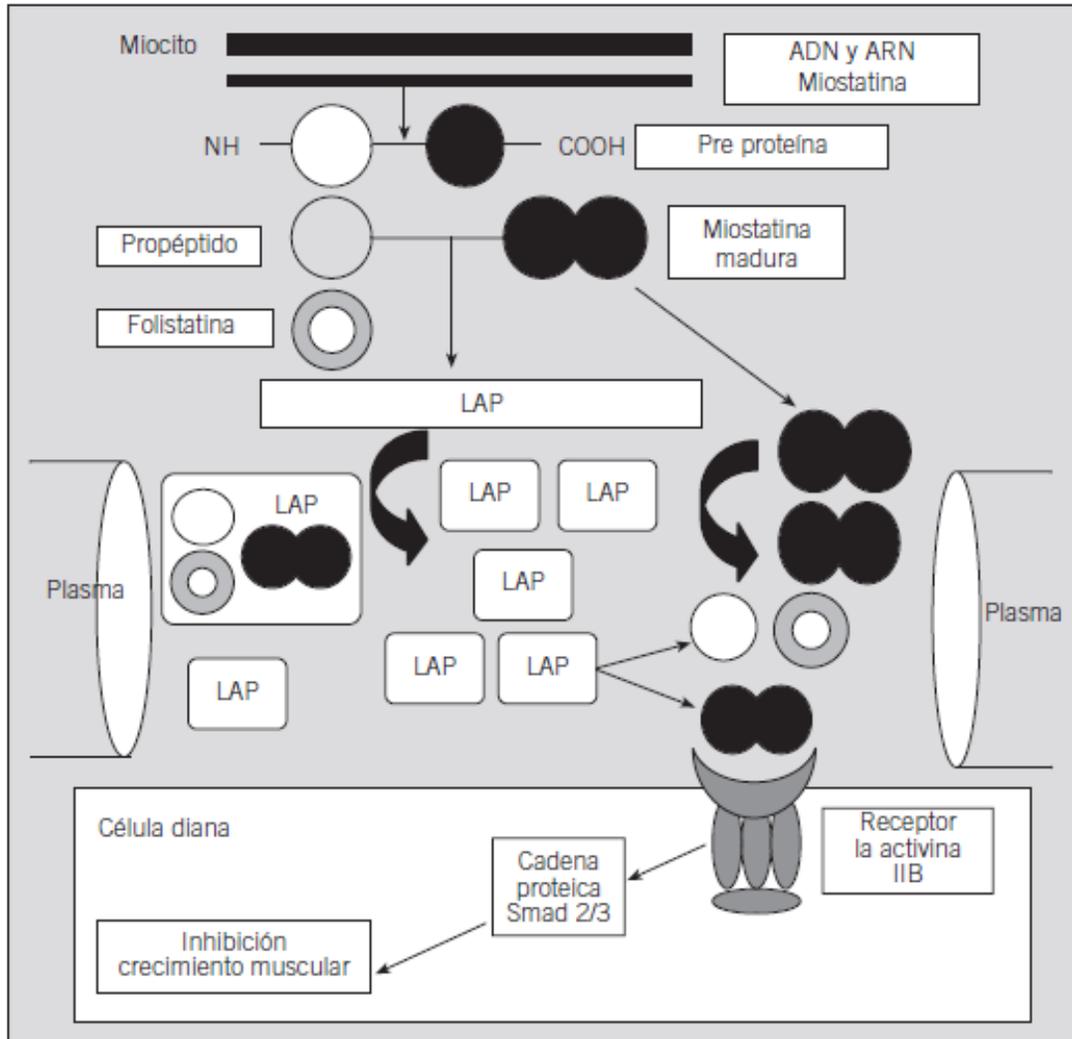


Figura 7. Esquema de la estructura de la Mstn en el complejo LAP (Péptido Latente Asociado), su procesamiento proteolítico y su posterior acción en el receptor de su célula diana. Tomada de Zamora et al., 2008.

La Mstn actúa canónicamente a través del receptor de activina para regular la expresión de los genes de miosina. La Mstn juega un papel importante en la especificación de los tipos de miofibras durante la diferenciación miogénica [32].

La Mstn señala a la célula mediante la vía del complejo del receptor compuesto por dos tipos de receptores tipo I y tipo II. [33]. Evidencia acumulada indica que la Mstn comparte su par de receptores con la activina específicamente con el receptor de activina ActRIIB y ActRIIA. La Mstn inicia su señalización a través del receptor ActRIIA el cual posee un dominio cinasa constitutivo. La unión de la Mstn hacia los receptores ActRIIs recluta el correspondiente receptor tipo I (Activina like cinasa-5 y 4 o ALK5/4) [33], formando un complejo de receptor heterotetramérico, el cual transfosforila el receptor tipo I en el motivo de Gly/Ser llamado región GS. El complejo del receptor activado luego fosforila el receptor regulado por las proteínas Smad 2/3 que se oligomerizan con un mediador común Smad y co-Smad llamado Smad 4. El complejo Smad se transloca al núcleo donde interactúa con cofactores para regular transcripcionalmente sus genes blanco [34,35]. Estos participantes de Smad regulan de manera específica en un tipo celular, subconjuntos de genes blanco de genes de la señalización de la Mstn. Otro Smad, el Smad 7, sirve para derogar la señalización de la Mstn por medio de la estabilización de un bucle auto inhibitorio [34,36]. Primero, Smad 7 inhibe la expresión génica de la Mstn [36]. Después, Smad 7 inhibe al complejo Smad 2/3-Smad4 resultando en una inhibición de la señalización de la Mstn [35]. Interrumpiendo la participación de ALK-4 en el complejo del receptor evitando la acción de la Mstn sin efecto de la señalización de TGF- β , indicando un rol crítico en el efecto de la Mstn [37] (Figura 8).

El complejo nuclear de Smad 2/3/4 actúa como un factor de transcripción que regula la proliferación y diferenciación alterando los patrones transcripcionales y las cascadas de señalización involucradas en la miogénesis a través de los SBE (Smad Binding Elements) [38] (Figura 8).

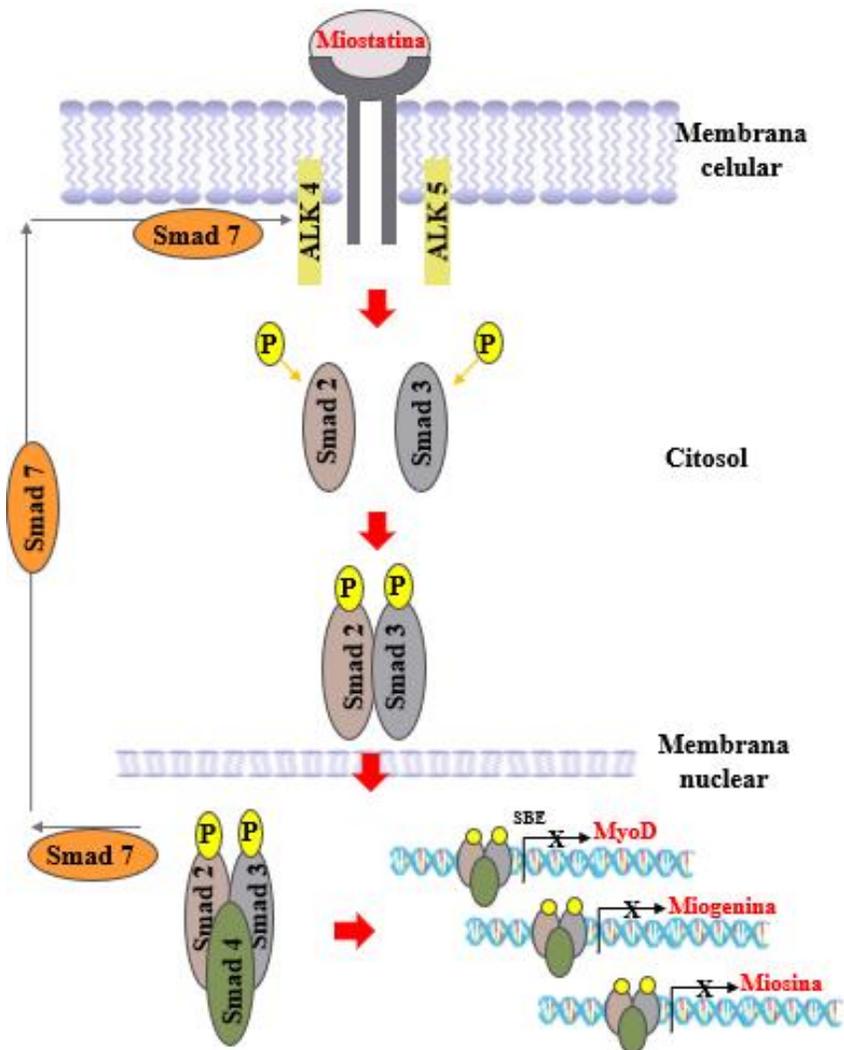


Figura 8. Función de la Mstn a nivel molecular y Smad 2/3/4 en sus blancos de inhibición transcripcional.
Tomado y modificado de Han et al 2013.

ANTECEDENTES

Estrategias de inhibición de la miostatina

Se ha encontrado que la vía de señalización de la Mstn ha sido inhibida competitivamente por pequeñas moléculas inhibidoras de unión de ATP como Dorsomorfina y el compuesto LDN-193189 [39]. Estos compuestos mostraron que son capaces de inhibir la señalización de una gran parte de receptores de la familia de los TGF- β , entre ellos los BMPs y los receptores de Activina IIA y IIB. Así mismo se demostró que Dorsomorfina y LDN-193189 inducen la vía de señalización de las SMAD2/3 y la represión de los factores miogénicos de transcripción [39].

Sin embargo, está claro que el uso de la Dorsomorfina y la LDN-193189 no es una terapia prometedora en pacientes que sufren diversas enfermedades asociadas con el desgaste muscular. Ya que se ha reportado la falta de especificidad de estas moléculas, pues comparten a varios miembros en común de la familia de los TGF- β [40].

En otro estudio se ha identificado una molécula de unión a ligando entre las dos subunidades β A de activina y fue identificada a través de un screening *in-silico* con una base de datos ZINC para identificar las interacciones. De entre 39 compuestos sin toxicidad significativa, se probaron en dos ensayos de activina bien establecidos: (transcripción de FSH β y apoptosis de las células HepG2), éste trabajo arrojó dos compuestos importantes: NUCC-474 y NUCC-555 con potencial de inhibir al receptor de Activina A. El ensayo de inhibición competitiva confirmó que NUCC-555 se unió al dímero de activina IIA (ActRIIA) impidiendo la formación del complejo de Activina A: ActRII con ALK4-ECD-Fc de manera dosis dependiente. [41]. NUCC-555 tiene la característica de que se une específicamente a Activina A comparado con Mstn [41].

Sin embargo, la desventaja que presenta esta molécula es que no se encuentra disponible comercialmente para su uso, así como su deficiente especificidad, por lo que se busca la identificación y caracterización de nuevos inhibidores capaces de realizar una mejor

inhibición, que sea así más específica y requiera concentraciones más bajas para así evitar interacciones cruzadas con otros blancos no deseados.

Por otra parte, estos datos demuestran una estrategia *in-silico* novedosa basada en identificar pequeñas moléculas antagonistas a la actividad de Mstn con un nivel altamente específico.

Por otro lado, los mecanismos fisiológicos y moleculares que causan el desgaste muscular aún son inciertos a pesar de estos avances. No hay terapias de confianza que prevengan o que contrarresten la atrofia muscular en muchos desordenes fisiológicos. Recientes reportes sugieren que estamos entrando a una nueva era terapéutica porque no solo bloqueando la señalización de la Mstn se puede prevenir la pérdida de la masa muscular, sino también se puede mejorar la supervivencia en condiciones catabólicas [41,18].

El potencial para desarrollar una estrategia de tratamiento es de gran interés y potencial, debido a que no es necesario manipular los genes bloqueando la señalización de la Mstn. Ya que como se ha discutido con anterioridad, la señalización de la vía de la Mstn se puede bloquear farmacológicamente y con precisión hacia un receptor específico de interés.

Métodos de modelaje molecular

La técnica de modelado molecular es una herramienta computacional que ha permitido estudiar la interacción que existe entre un fármaco/ligando con su diana, mediante la utilización de programas informáticos que representen las estructuras y el comportamiento de las moléculas. Así mismo, permite predecir si una molécula va a unirse a un receptor determinado, y por lo tanto si puede ser un punto de partida para el diseño y síntesis de fármacos [42].

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) de una molécula o de complejos moleculares son una herramienta imprescindible que ha contribuido significativamente a la investigación

de las propiedades estructurales y dinámicas de los complejos proteicos, ya que pueden proporcionar bastante información a nivel atómico [43].

El modelaje molecular estudia la interacción entre un ligando y su receptor mediante el estudio y el análisis de las fuerzas de unión entre ambas estructuras [42]. La unión entre un ligando y su receptor es considerada como una reacción de asociación simple y su constante de asociación es más alta cuanto mayor es la energía que se libera en la interacción entre el ligando y el receptor [42].

En función del conocimiento o desconocimiento de la estructura del ligando y del receptor existen diferentes técnicas computacionales de modelado molecular (Tabla 1) que se pueden aplicar para que el proceso de descubrimiento sea mucho más sencillo [42].

		RECEPTOR Y SU ESTRUCTURA	
		CONOCIDO	DESCONOCIDO
LIGANDO Y SU ESTRUCTURA	CONOCIDO	<ul style="list-style-type: none"> • Interacciones entre ligando-receptor • Dinámica molecular y técnicas de simulación de <i>docking</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Modelo de grupos funcionales activos • Búsquedas en 3D basadas en el ligando/farmacoforo • Modelo QSAR 2D y 3D
	DESCONOCIDO	<ul style="list-style-type: none"> • Búsquedas 3D basadas en el diseño y la estructura • Diseño de novo 	<ul style="list-style-type: none"> • Generación de estructuras en 3D • Medidas de diversidad molecular y de similitud química • Química combinatoria

Tabla 1: Técnicas *in-silico* de modelado molecular en función del conocimiento de la estructura del ligando y el receptor. Modificado de Sánchez Montero., 2016

A diferencia de los métodos experimentales que proporcionan información estructural y dinámica sobre un gran número de moléculas, y dentro de la ventana de tiempo del método experimental, los métodos *in-silico* presentan múltiples ventajas, particularmente la dinámica molecular (MD), ya que pueden llegar a tener una resolución atómica alta y el tiempo de observación en la escala de tiempo resulta en 10^{-6} segundos o más [44]. Una desventaja en el diseño de fármacos es el hecho de que una única molécula sea capaz de unirse a dos dianas distintas, de forma que tenga dos actividades farmacológicas diferentes, lo que casualmente puede ser desfavorable si empeora la actividad farmacológica o resultando en ser indeseado si produce efectos adversos [45].

Los cálculos de simulación computacional pueden proporcionar información muy detallada sobre la estructura y la dinámica de las moléculas en interacción, siempre y cuando se basen en un modelo preciso de escala atómica y con campos de fuerza apropiados [46].

A partir de una molécula conocida, estas técnicas pueden ser aplicadas con el fin de conseguir nuevos fármacos que impliquen un avance terapéutico innovador. De esta forma, se pueden conseguir fármacos que posean un mayor índice de especificidad, así como de precisión (lo que se traduciría a la disminución de los efectos adversos y con una mayor potencia, implicando una disminución de la dosis).

JUSTIFICACIÓN

Es importante la búsqueda y caracterización de nuevos inhibidores de funciones de moléculas, ligadas a enfermedades relacionadas con distrofias musculares y a afecciones músculo-esqueléticas de diferentes etiologías. En el caso particular de la función de la Mstn, se ha demostrado que está relacionada con la limitación del desarrollo muscular.

La Mstn actúa como un potente regulador negativo del crecimiento muscular y está incrementada en músculos de modelos animales y pacientes con ciertas condiciones catabólicas, ya que esta suprime el desarrollo muscular y su ausencia por lo contrario estimula su crecimiento.

Se ha observado que la señalización de la vía de la Mstn se puede bloquear farmacológicamente y con precisión hacia una molécula en específico de interés.

Así mismo es necesaria la identificación de nuevos inhibidores de la Mstn como posible estrategia terapéutica para enfermedades del funcionamiento muscular

Los antagonistas a la Mstn como terapia para pacientes con daño muscular es un importante tema de investigación clínica ya que con esto se pretende conseguir una mejoría en este tipo de condiciones.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar, analizar y caracterizar nuevos inhibidores específicos de miostatina mediante modelaje molecular con el objetivo de obtener candidatos capaces de inducir la diferenciación muscular.

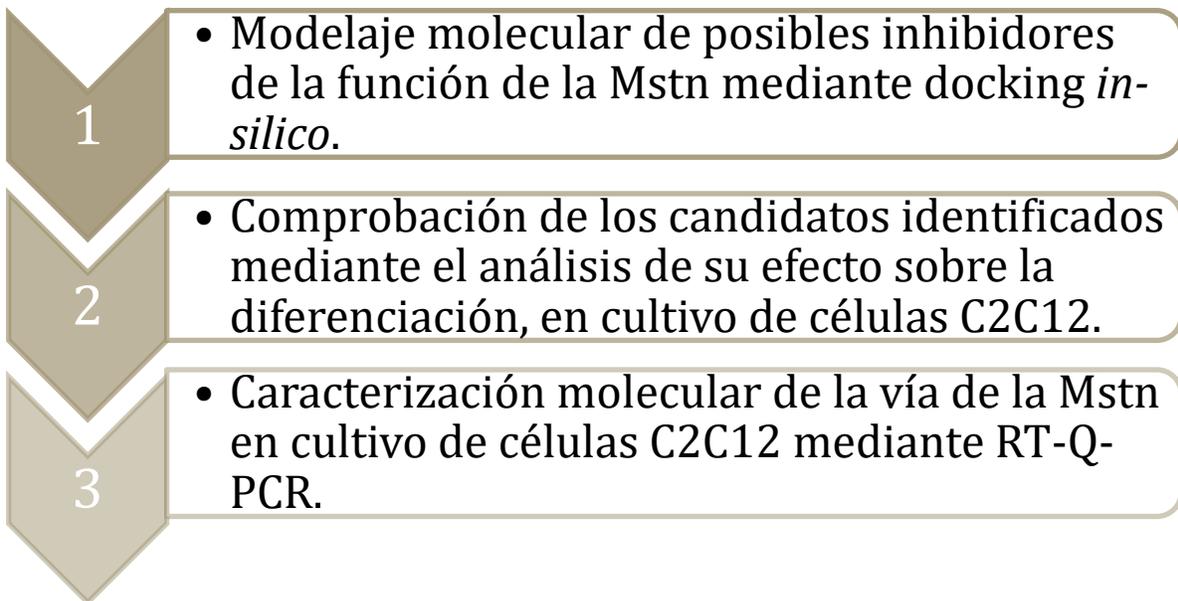
Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar *in-silico* moléculas candidatas inhibidoras de la miostatina obtenidas a través de modelaje molecular.
2. Comprobar la actividad biológica de las moléculas identificadas sobre la diferenciación muscular en un sistema *in-vitro* de diferenciación.
3. Determinar el efecto de los compuestos identificados sobre la vía de señalización de la miostatina en un sistema *in-vitro* de diferenciación.

HIPOTESIS

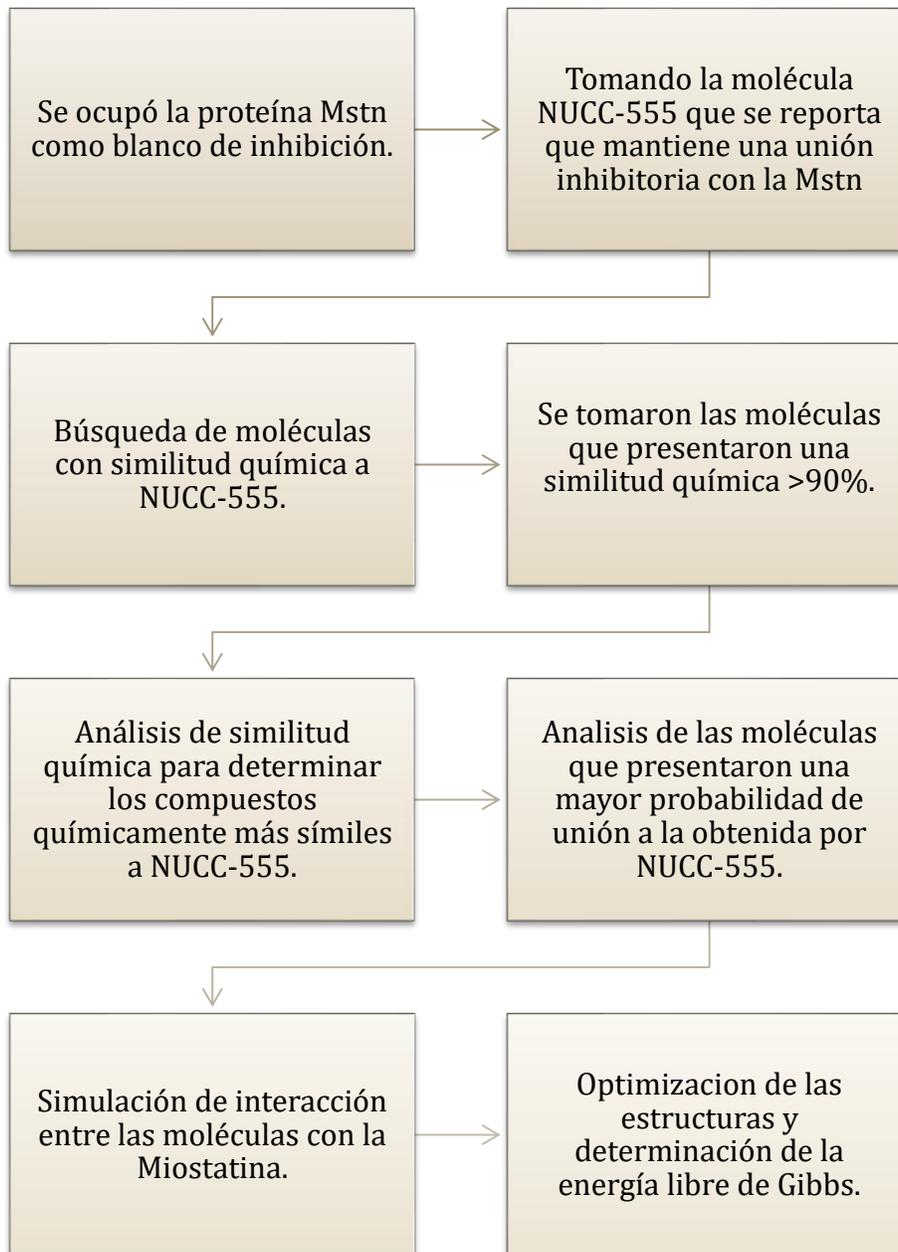
A partir del modelaje molecular se identificarán nuevos inhibidores de la función de la miostatina en el músculo esquelético de ratón y tendrán un efecto regulador positivo sobre la diferenciación muscular.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

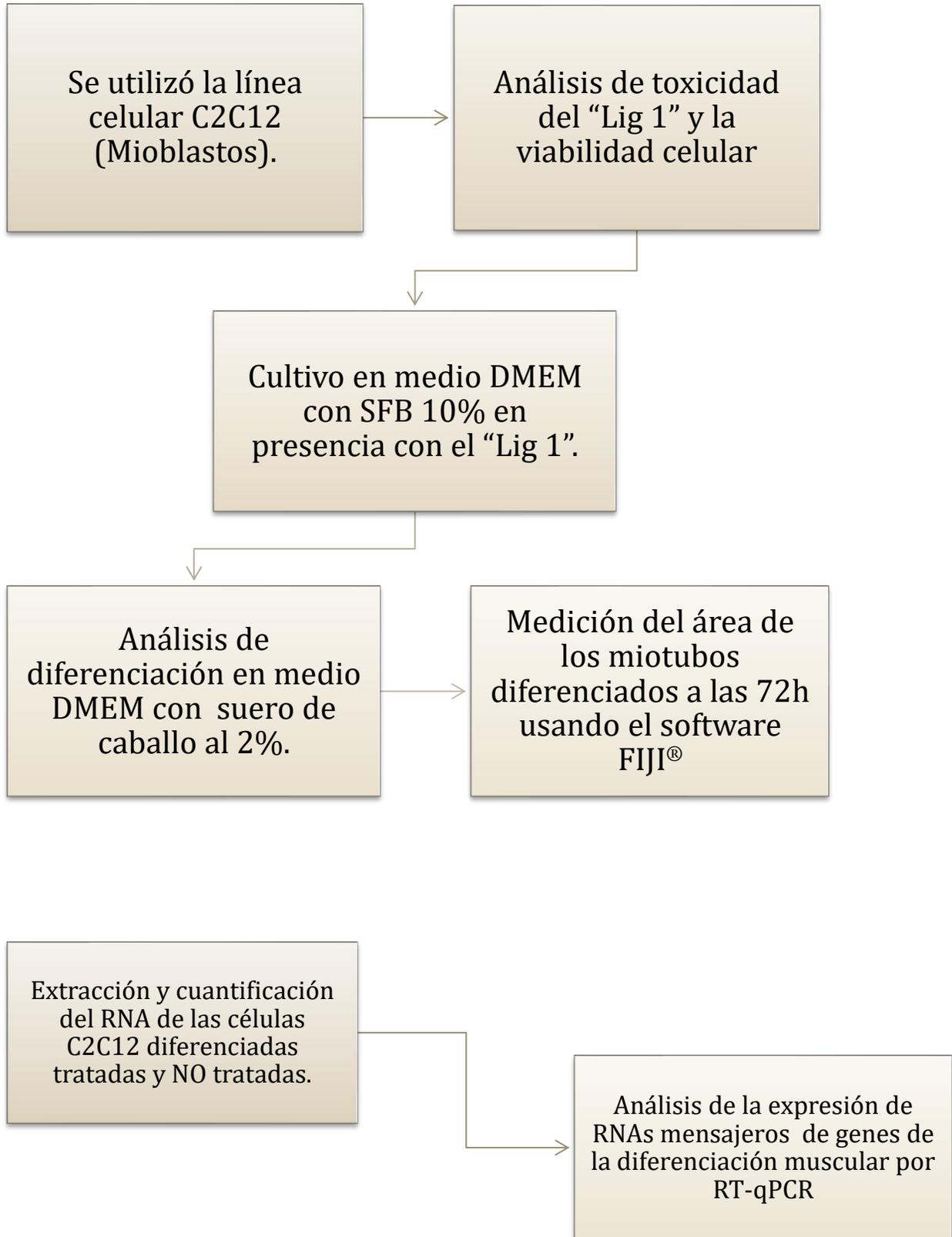


METODOLOGÍA

Metodología para el modelaje molecular



Metodología para el análisis *in-vitro*



Metodología para la caracterización de la diferenciación por RT-qPCR

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelaje molecular de posibles inhibidores de la función de la miostatina en el músculo esquelético.

Se utilizó la proteína Mstn como blanco de inhibición, partiendo de la estructura de la proteína cristalizada de *Mus musculus*, que está dilucidada mediante experimentos de rayos X con una resolución de 2.25Å y depositada en la base de datos de Protein Data Bank (PDB), con un folio de identificación 5J11. <https://www.rcsb.org/structure/5J11> .

Con base en los antecedentes de que NUCC-555 es capaz de unirse a Mstn de manera secundaria y generar una inhibición no específica, se decidió utilizarla como molécula de partida ya que presenta ventajas como molécula no citotóxica y de igual forma que posee alta solubilidad. NUCC-555 fue identificada con el número de acceso de 2 bases de datos curadas donde se encuentran compuestos químicos bioactivos y con propiedades de tipo farmacéuticas y para investigación, en su mayoría comercialmente disponibles, ChEMBL: 3589518 https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL3589518/ y ZINC: 12100047. <https://zinc.docking.org/substances/search/?q=ZINC%3A+12100047> .

Partiendo de la molécula NUCC-555, se realizó una búsqueda de similitud química con el servidor SwissSimilarity <http://www.swisssimilarity.ch/> , dentro de la base de datos comercialmente disponibles, “ZINC-Drugs-like” <https://zinc.docking.org/> , cuyo repositorio es de 1.06×10^7 moléculas. Esta base de datos considera la similitud química mediante un análisis combinado de los métodos Fingerprints, Electroshape. Y Spectrophores. Estos métodos son utilizados de manera canónica en análisis de similitud química ya que nos arrojan información sobre la naturaleza química y las cargas totales de cada molécula: [http://www.swisssimilarity.ch/faq.php#What are the available screening methods](http://www.swisssimilarity.ch/faq.php#What%20are%20the%20available%20screening%20methods) .

De los resultados del análisis se tomaron las moléculas que presentaron una similitud química mayor al 90%.

Posteriormente se utilizó el programa de análisis DATAWARRIOR <https://openmolecules.org/datawarrior/index.html>, y se realizó un análisis de similitud química tanto a nivel estructural como a nivel de grupos funcionales y de cargas, considerando el método de componente principal y considerando los tres componentes principales se determinaron los 10 compuestos químicamente más similares a NUCC-555.

Los 10 compuestos seleccionados fueron sometidos a un cálculo basado en la teoría de los funcionales de la densidad (DFT), con el programa Molden (<http://cheminf.cmbi.ru.nl/molden/>). Esto se hizo utilizando el programa Gaussian y empleando el clúster YOLTLA (Universidad Autónoma Metropolitana) <http://www.lancad.mx/?p=1>. Con esos datos, se determinó la predicción de las estructuras más estables para cada una de las moléculas, así como la determinación de cargas asociadas a las estructuras y las funciones Fukui para la caracterización de cada molécula, todo esto utilizando el programa VESTA (Visualization System for Electronic & Structural Analysis) <https://jp-minerals.org/vesta/en/>.

Posteriormente, los 10 compuestos junto con la Mstn se sometieron a un análisis de predicción de unión utilizando el programa BindScope <https://www.playmolecule.org/BindScope/> en el servidor Play Molecule <https://www.playmolecule.org/> que considera la probabilidad de unión entre la molécula y la proteína mediante la técnica de “*machine learning*”. Esta técnica consiste en la predicción de modelos geométricos que determinan una unión de manera estadística. De dicho resultado se tomaron solo aquellas moléculas que presentaron una mayor probabilidad de unión a la obtenida por NUCC-555.

Previamente se realizó una estimación y la determinación de la ΔG de unión (Energía libre de Gibbs, la cual es definida por la cantidad máxima de trabajo que se puede extraer de un sistema cerrado termodinámicamente [47]) para el sistema Proteína-Ligando mediante el software BFEE (Binding Free Energy Estimator) <https://pypi.org/project/BFEE2/>. A continuación, se realizó la preparación de la simulación de interacción entre las moléculas

seleccionadas con la proteína Mstn; para dicho efecto se realizó una dinámica molecular de la proteína utilizando el programa NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> en el clúster OLINKA (Universidad Autónoma del Estado de México). Posteriormente se realizaron cálculos de dinámica molecular para cada complejo proteína/molécula utilizando el mismo programa y clúster. Las estructuras optimizadas y los archivos de salida se ocuparon para construir los archivos necesarios para correr los cálculos de determinación de energía libre de Gibbs mediante el programa VMD (Visual Molecular Dynamics) <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> , Finalmente, para calcular la energía libre de Gibbs se utilizó el método de simulación molecular ABF (Adaptative Biasing Force) que consiste en el análisis de fuerzas electrostáticas entre el ligando y el receptor utilizando el programa NAMD <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, empleando los clústeres OLINKA (Universidad Autónoma del Estado de México) y Xiuhcoatl (CINVESTAV).

A continuación, se detallan los programas utilizados en el presente trabajo:

1. DataWarrior. <http://www.openmolecules.org/datawarrior/> (Para la construcción de la base de datos de moléculas similares a Mstn y determinación de similitud química)
2. Gaussian <https://gaussian.com/> (Para los cálculos DFT)
3. VESTA <http://jp-minerals.org/vesta/en/> (Para la visualización de los orbitales moleculares HOMO, LUMO y funciones Fukui)
4. BFEE. <https://pypi.org/project/BFEE2/> (Para la estimación de la ΔG de unión para el sistema Proteína-Ligando)
5. NAMD <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> (Para la dinámica molecular y método ABF)
6. VMD <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> (Para la visualización de la dinámica molecular y para construir los archivos de entrada para cálculos ABF)

Análisis de toxicidad

Para la determinación de la toxicidad de los compuestos identificados sobre la línea celular comercial derivada de músculo esquelético de ratón C2C12 (ATCC CRL-1772), la cual es posible analizar la viabilidad a diferentes tiempos de la incubación.

Se hizo el sembrado por duplicado de 100,000 células para cada concentración a utilizar. El sembrado se realizó en una caja de 6 pozos, utilizando 100,000 células por pozo, posteriormente los mioblastos C2C12 se mantuvieron en condiciones de proliferación durante 48 h en medio DMEM (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibióticos (Penicilina y estreptomycin). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5.0% todo esto se realizó para las células tratadas con el “Lig 1”, así como en las utilizadas como control tratadas con DMSO. Para el conteo de número de mioblastos en tratamiento se realizó un conteo manual con cámara de Neubauer.

Cultivo celular

Para la determinación de la actividad de los compuestos identificados sobre la diferenciación celular, se utilizó la línea celular comercial derivada de músculo esquelético de ratón C2C12 (ATCC CRL-1772), la cual es posible inducir la diferenciación celular y analizar la dinámica de activación de genes de interés a determinados tiempos de la diferenciación.

Los mioblastos C2C12 se mantuvieron en condiciones de proliferación en medio DMEM (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibióticos (Penicilina y estreptomycin). Para inducir su diferenciación a miotubos, se reemplazó el medio con DMEM suplementado con suero de caballo al 2% y 1% de antibióticos. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5.0% todo esto se realizó para las células tratadas con el inhibidor a probar, así como en las utilizadas como control tratadas con DMSO.

Caracterización de la eficiencia de diferenciación muscular.

Se hizo la extracción del RNA de las células C2C12 tratadas con el inhibidor en miotubos diferenciados a las 0, 24 y 72 horas; Como se describe a continuación: Se agregó 1ml de

Trizol (Ambion) y fue incubado por 5 min, posterior a eso se homogenizo y se centrifugó a 16,000 g por 15 min a 4°C, acto seguido de recuperar el sobrenadante y agregar 200 µL de Cloroformo (MERK) se sometió a Vortex durante 30 segundos, se incubó por 3 min y se centrifugó a 16,000 g por 15 min a 4°C, acto seguido se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadieron 500 µL de Isopropanol (VWR), se homogenizó, se incubó por 30 min a -20°C y se centrifugó a 16,000 g por 15 min, posterior a eso se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con 500 µL de etanol al 75% (SIGMA). Y se centrifugó a 16,000 g por 15 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el RNA fue resuspendido en 100 µL de H₂O libre de RNAsas; Finalmente se determinó su concentración e integridad mediante espectrofotometría (NANODROP) y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

Posteriormente se obtuvo el cDNA de cada muestra mediante retro-transcripción de las muestras correspondientes siguiendo el siguiente procedimiento:

Mezcla A:

- 1.5 µL de Oligo dT [50 µM] (Invitrogen)
- 1µg de RNA total.
- 1 µL de dNTPs Mix [10nM] (Invitrogen)
- H₂O libre de RNAsas para ajustar a 12µL.

Esta mezcla fue calentada a 65°C por 5 min, posteriormente se colocó a 0°C y se añadió una segunda mezcla que contenía:

Mezcla B:

- 4µL de Buffer First-strand 5x (Tris-HCl [250mM], pH 8.3, KCL [375mM], MgCl₂ [15mM]) (Invitrogen)
- 2µL de DTT [50 mM] (Invitrogen)
- 1µL H₂O libre de RNAsas

Y se incubó a 37°C/ 2min, posteriormente se añadió 1µL de retro-transcriptasa RT-M-MLV (200 U/µL) y se incubó a 37°C por 50 min y después a 70°C por 10 min.

Tras la retro-transcripción se procedió a la realización de la amplificación por PCR, para esto se preparó la siguiente mezcla:

- 2.5µL de Buffer para PCR 10x (Invitrogen)
- 0.75µL de MgCl₂ [50mM] (Invitrogen)
- 0.1µL de Taq DNA Polimerasa (5 U/µL) (Invitrogen)
- 0.5µL de dNTPs [10mM] (Invitrogen)
- 0.75µL de Primer Forward [10µM] (Oligo T4) (Tabla 1)
- 0.75µL de Primer Reverse [10µM] (Oligo T4) (Tabla 1)
- 2µL de cDNA obtenido de la previa retro-transcripción.
- 17.5 µL de H₂O libre de DNAsas.

Dicha mezcla se sometió a incubación en termociclador siguiendo las siguientes fases: 2 min a 94°C, posteriormente 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 la extensión total de los amplicones; Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Posterior a eso se realizó la qPCR utilizando PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) para cada muestra por duplicado tomando las siguientes condiciones de reacción:

- 2 min de desnaturalización inicial a 95°C (1 Ciclo)
- 10 min de Hold Activation Elongation 70°C (40 Ciclos)
- 2 min de alineamiento 50°C (misma para cada uno de los primers usados) (40 Ciclos)
- 15 min de disociación 90°C (1 Ciclo)

Nota: Para el análisis de expresión de marcadores de diferenciación mediante RT-PCR tanto como para la RT-qPCR, los primers que se utilizaron para los Genes de RSP18, MyoD, MyoG, MHCI y MHCIIB se encuentran en la Tabla 2.

GEN	Secuencia
mRSP18 Fw	AACGGTCTAGACAACAAGCTG
mRSP18 Rv	AGTGGTCTTGGTGTGCTGAC
mMyoD Fw	TGATGGCATGATGGATTACAGCG
mMyoD Rv	GTAGTAGGCGGTGTCGTAGC
mMHCIIB Fw	TCAATGAGATGGAGATCCAGCTGAAC
mMHCIIB Rv	GTCCAGGTGCAGCTGTGTGTCCTTC
mMHCI Fw	ACCTACTCGGGCCTCTTCTGC
mMHCI Rv	AGGGGCCTCGCTCCTCTTCTT
mMyoG Fw	CAGTGAATGCAACTCCCACA
mMyoG Rv	GAGCAAATGATCTCCTGGGTT

Tabla 2. Primers utilizados en los análisis de RT-PCR y RT-qPCR

Cuantificación del área de miotubos por Fiji

Se hizo la medición del área promedio de 5 miotubos por fotografía tomada para cada muestra en cultivo a las 72 horas de diferenciación en presencia del “Lig 1” [25 μ M] y DMSO [25 μ M] como control. Para dicho procedimiento se tomaron los 5 miotubos más representativos de cada foto y se tomaron 5 fotos en campos diferentes de cada muestra, y de esta forma se hizo la medición seleccionando el perímetro de cada miotubo en cuestión y utilizando las siguientes herramientas.

- Microscopio óptico con objetivo a 40X
- Cámara monocromática *NIS-Elements Nikon* con objetivo a 2X
- *Fiji-ImageJ*.

Análisis Estadístico

Para el análisis del área de los miotubos en los ensayos de cultivos de células C2C12, se escanearon y se analizó el área de 5 miotubos representativos de cada preparación con el programa Fiji de ImageJ. Todos los resultados obtenidos se expresaron como un promedio \pm error estándar de la media (SEM). Para evaluar diferencias entre los grupos clasificados se realizó un análisis T-Student (t-test). Los gráficos y datos estadísticos fueron realizados con el programa Graphpad PRISM-8.

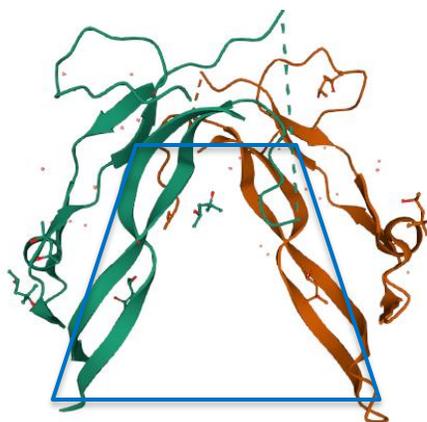
Para el análisis de los ensayos de RT-qPCR, todos los resultados obtenidos fueron normalizados respecto a la condición control y se expresaron como un promedio \pm error estándar de la media (SEM). Para evaluar diferencias entre los grupos clasificados se realizó un análisis de varianza de dos vías (two way-ANOVA). Los gráficos y datos estadísticos fueron realizados y procesados con el programa Graphpad PRISM-8.

RESULTADOS

Modelaje molecular de posibles inhibidores de la función de la miostatina en el músculo esquelético.

1.a Proteína Miostatina como blanco de inhibición

Se partió de la estructura cristalográfica de la Mstn de *Mus musculus*, dilucidada mediante experimentos de rayos X con una resolución de 2.25Å, de la base de datos de Protein Data Bank (PDB). y se utilizó su dominio de unión como blanco de inhibición



<https://www.rcsb.org/structure/5J11> (Figura 9).

Figura 9. Proteína Mstn (GDF-8) cristalizada de ratón (*Mus musculus*) a una resolución de 2.25Å. En verde el primer monómero de Mstn y en Naranja el segundo monómero y su dominio de unión en azul. Fuente PDB.

<https://www.rcsb.org/structure/5J11> .

1.b Determinación de las moléculas candidatas para el análisis de similitud química.

Como resultado de una búsqueda en la literatura y bases de datos de moléculas se tenía identificado que el compuesto NUCC-555 mantenía una unión capaz de generar una inhibición específica y significativa de manera dosis dependiente hacia Activina con una concentración de [5.37µM] siendo estabilizado por 3 puentes de hidrógeno en su sitio de unión. Sin embargo, en ese mismo estudio se logró identificar de manera secundaria la unión de NUCC-555 hacia Mstn a una mayor concentración de [47.92µM], siendo capaz de generar

una inhibición con mucho menor afinidad y siendo estabilizado únicamente por un puente de hidrógeno en su sitio de unión (Figura 10) [41]. Con base en esto, decidimos continuar con la búsqueda de posibles inhibidores con mucho mayor afinidad y alta especificidad hacia Mstn.

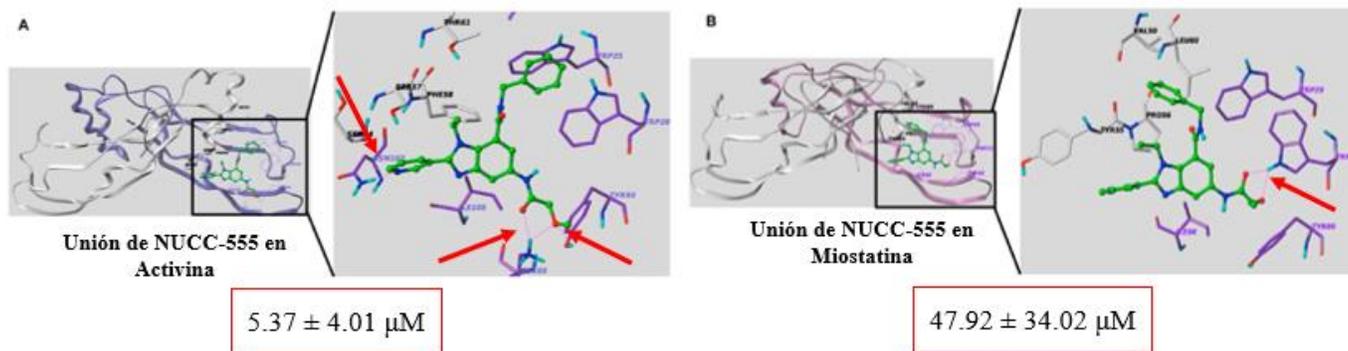


Figura 10. Estrategia *in-silico* basada en identificar pequeñas moléculas antagonistas a la vía de señalización de Mstn. En el panel **A**) (izquierdo) siendo estabilizado por 3 puentes de hidrógeno (Flechas rojas). Sin embargo, en el panel **B**) (derecho) se observa que NUCC-555 es capaz de unirse de manera secundaria a Mstn siendo estabilizado por 1 puente de hidrogeno (flecha roja). Modificada de Zhu et al., 2

015

A partir de estas observaciones se realizó una amplia búsqueda en la base de datos de SwissSimilarity para obtener las moléculas que estructuralmente se parecieran a NUCC-555 (Nuestra molécula de referencia y de partida), esto con el objetivo de encontrar posibles compuestos candidatos que puedan ser capaces de inhibir de manera específica a Mstn y de manera precisa el dominio de unión llamado región bisagra, que es la región de la proteína Mstn que se une directamente al receptor de activina tipo II (ACTRII) (Figura 11B), para realizar la función de inhibidor de la diferenciación muscular.

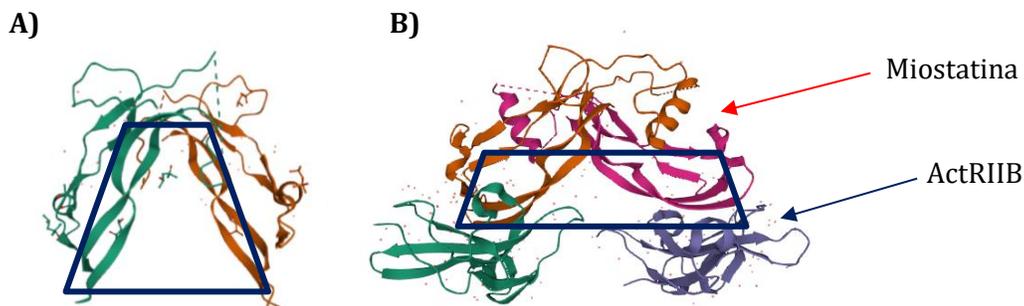


Figura 11. A) Región bisagra, dominio de B) unión de Mstn al receptor de activina tipo II (ActRIIB)

Después de la búsqueda en la base de datos en Swiss Similarity se obtuvieron un total de 110 moléculas con un score de similitud química mayor al 90% respecto a NUCC-555 (Figura 12). Para ello el software como fundamento utiliza un análisis combinando los métodos Fingerprints, Electroshape y Spectrophores <http://www.swiss similarity.ch/>.

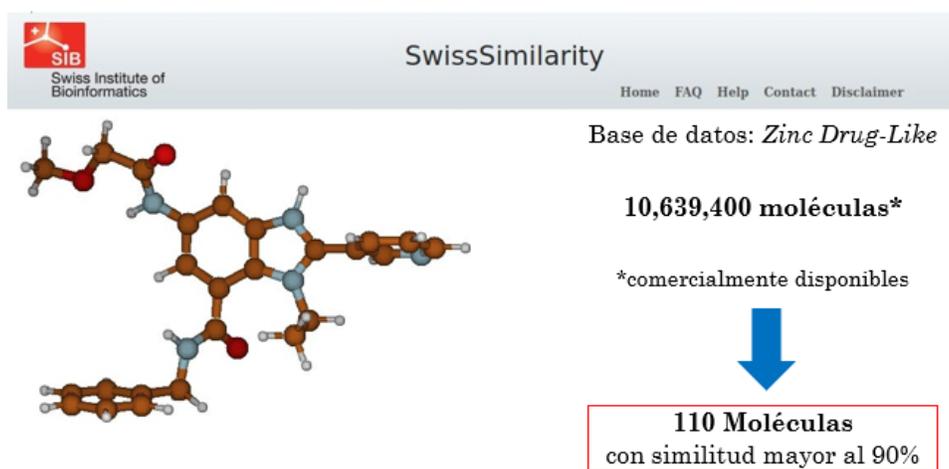


Figura 12. Representación de la base de datos de SwissSimilarity, y la obtención de 110 moléculas más similares a NUCC-555 del total de 10,639,400 compuestos. Tomada de SwissSimilarity.

1.c Determinación de la similitud química.

A partir de las 110 moléculas seleccionadas, se empleó el programa de análisis DATAWARRIOR <http://www.openmolecules.org/datawarrior/> y se hizo un análisis de similitud química que consideró el método de componente principal, donde cada uno de estos componentes (ejes X, Y y Z) mide una variable diferente de cada una de las moléculas, siendo estas variables la máxima varianza, la covarianza y la diferencia entre moléculas analizadas. Con el objetivo de reducir la dimensionalidad de la muestra y considerando los tres componentes principales, se identificaron las moléculas químicamente, físicamente y estructuralmente análogas a NUCC-555 (Figura 13).

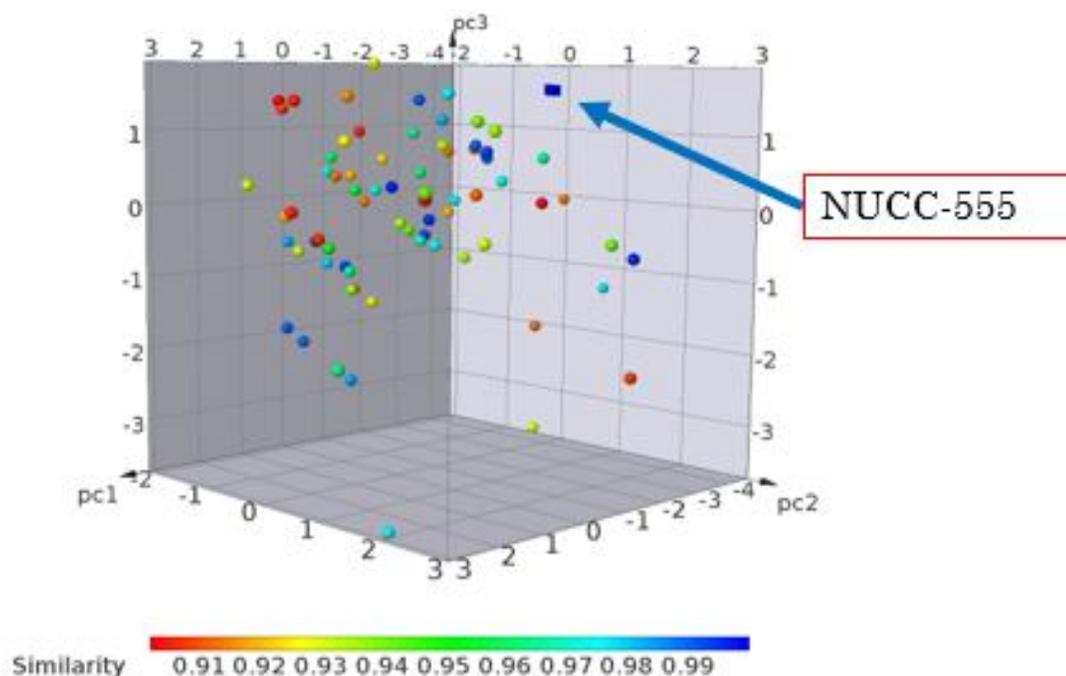


Figura 13. Representación gráfica de análisis por componente principal, A mayor similitud química el valor es más cercano a “1” y se representa mediante color azul a los 9 compuestos resultantes del análisis. El compuesto NUCC-555 se encuentra en azul ya que es la molécula de referencia. Tomada de DataWarrior

<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>

Los 10 compuestos totales (9 del análisis anterior más la molécula de referencia NUCC-555) fueron estudiados y se sometieron a un cálculo basado en la DFT (Teoría funcional de la densidad), el cual es un cálculo que nos permite conocer la densidad electrónica de una molécula en 3D <https://gaussian.com/> Una vez hecho eso se hizo la determinación de la predicción de las estructuras más estables para las moléculas en cuestión, así como la determinación de cargas asociadas a los átomos y los orbitales moleculares y de igual forma las funciones Fukui (para la caracterización de la reactividad química molecular) de cada compuesto, usando el programa *Gaussian 09 suite* <https://gaussian.com/> y empleando el clúster YOLTLA (Figura 14) <http://www.lancad.mx/?p=1> .

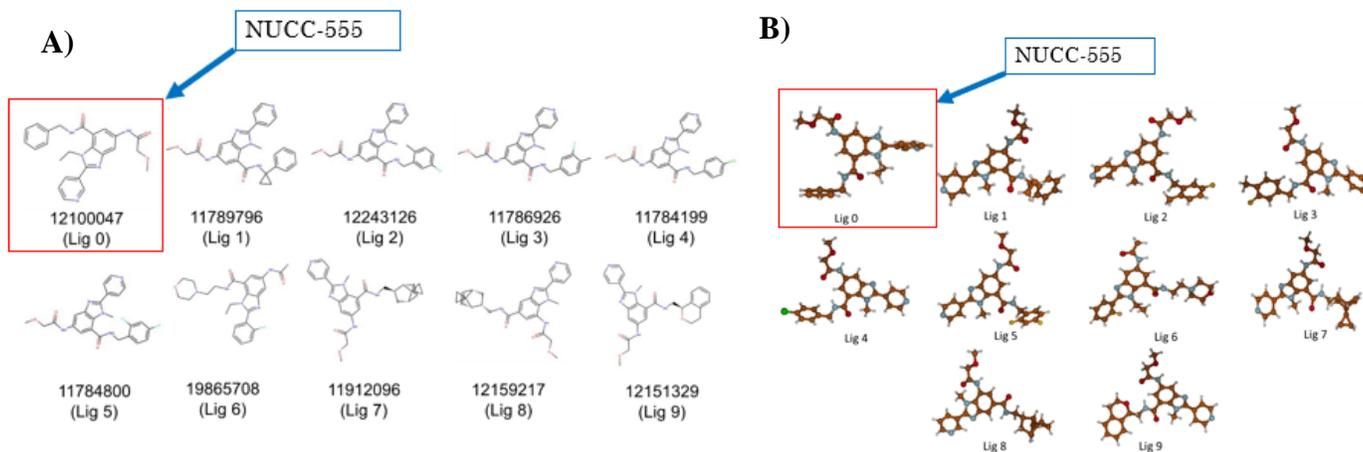


Figura 14. Representación de la estructura de NUCC-555 y las 9 moléculas más similares. En el panel izquierdo **14 A)** Se representa el número de identificación de la base de datos ZINC, y, entre paréntesis, la nomenclatura utilizada posteriormente para referirse a cada molécula. Y en el panel derecho **14 B)** se muestra la geometría química más estable para cada molécula, determinada mediante cálculos DFT. Tomada de *Gaussian 09 suite* <https://gaussian.com/>.

1.d Determinación de la probabilidad de unión con Mstn.

Posteriormente, los 10 compuestos que se obtuvieron del análisis junto con la proteína Mstn se sometieron a un análisis de predicción de unión en el servidor de BindScope <https://www.playmolecule.org/BindScope/>. Este considera la probabilidad de unión entre la molécula y la proteína mediante la predicción con “*machine learning*” (esta técnica consiste en la predicción de modelos geométricos que determinan una unión de manera estadística). De dicho resultado se seleccionaron las 4 moléculas que presentaron un score de probabilidad de unión mayor a 0.8, lo que se traduce en una mayor probabilidad de unión a Mstn en comparación con la obtenida por NUCC-555, nuestra molécula de referencia (Tabla 3).

MOLÉCULA	PROBABILIDAD DE UNIÓN
Ligando 0 (NUCC-555)	0.36
Ligando 1	0.95
Ligando 2	0.85
Ligando 3	0.82
Ligando 4	0.80
Ligando 5	0.75
Ligando 6	0.65
Ligando 7	0.04
Ligando 8	0.0043
Ligando 9	0.0043

Tabla 3. Probabilidad de unión de las moléculas a Mstn. (Se decidió continuar los análisis con los ligandos que exhibieran una probabilidad de unión superior a 0.8 (Lig 1-4) y utilizando NUCC555 (Lig 0) como referencia).

Finalmente, se realizó la preparación de la simulación de interacción molecular entre los compuestos seleccionados con la proteína Mstn. Para ello se realizó una dinámica molecular de la proteína con cada ligando por individual, a través de cálculos ABF (Adaptive Biasing Force) para determinar la energía libre de unión absoluta para cada sistema proteína-ligando, utilizando el programa NAMD <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> en el clúster OLINKA.

Posteriormente se hicieron cálculos de dinámica molecular para cada complejo Mstn/Ligando resultante el cálculo de la energía libre de unión. Para eso se preformó la unión por 50ns utilizando el software BFEE (Binding Free Energy Force) <https://pypi.org/project/BFEE2/>. Los resultados arrojados por dichos cálculos son presentados en la Tabla 4. Cabe señalar que las estructuras optimizadas y los archivos de salida se emplearon para construir los archivos que se requirieron para correr los cálculos de determinación de energía libre de Gibbs.

MOLÉCULA	ΔG (KCAL/MOL)
Ligando 0	-6.70
Ligando 1	-10.22
Ligando 2	-3.84
Ligando 3	-1.52
Ligando 4	+0.16

Tabla 4. Energía de unión libre absoluta a Mstn para cada ligando.

Teniendo en cuenta estos resultados se determinó proponer al “Lig 1” como la molécula con mayor afinidad y, por lo tanto, con mayor probabilidad de inhibición de la Mstn en comparación con el ligando reportado (NUCC-555).

1.e Determinación de la estabilidad de unión del complejo Mstn-Ligando

La estabilidad de unión del complejo de la proteína Mstn con los ligandos analizados se examinó preformando una simulación molecular utilizando el software NAMD <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, simulando una interacción sin interrupción durante 400 ns. La estabilidad de unión del complejo en cuestión se analizó mediante la RMSD (Desviación cuadrática media) y el Rg (Radio de giro). De todo este análisis se muestran los valores de la RMSD estables de los átomos para la Mstn en unión de los compuestos Lig 0 (NUCC-555) y “Lig 1” (ZINC-11789796), respectivamente (Figura. 15A). El valor de RMSD proporciona la estabilidad de unión de todo el complejo al unirse el ligando, mientras que el valor del Rg, proporciona información sobre la dimensión general y la forma de la proteína Mstn al tener unido el ligando. Los valores promedio de Rg para Lig 0 fueron de 2.3 nm mientras que para “Lig 1” fueron de 1.8 nm manteniendo la estabilidad a lo largo de la simulación (Figura. 15B).

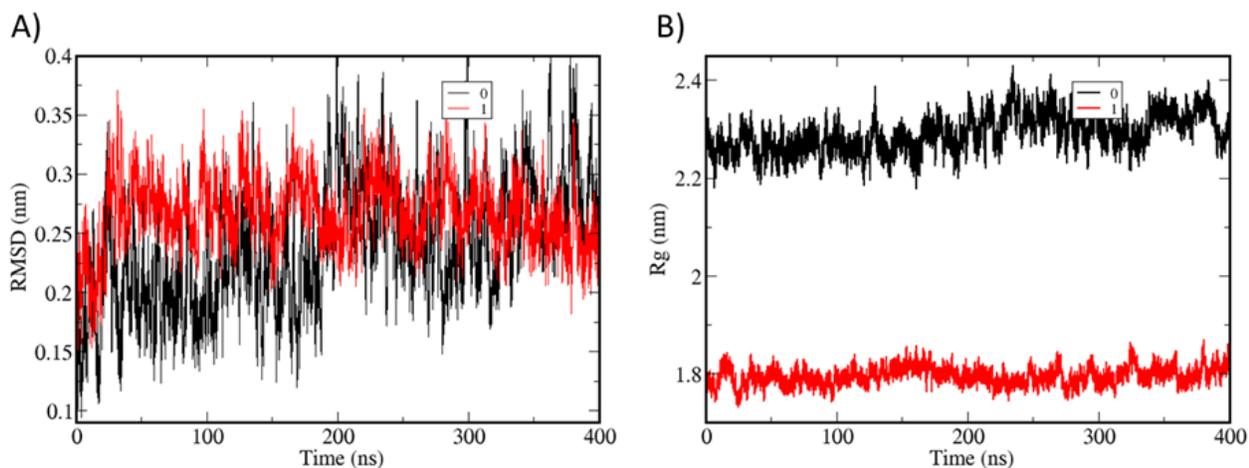


Figura 15 A) Dependencia del tiempo de las desviaciones cuadráticas medias (RMSD) de “Lig 0” (Negro) o “Lig 1” (ZINC11789796) (Rojo) en complejo con Mstn y B) Evolución en el tiempo del Radio de Giro (Rg) para los compuestos “Lig 0” (Negro) o “Lig 1” (Rojo) en complejo con Mstn. Tomada de NAMD

<https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

Finalmente, para robustecer los análisis se decidió realizar los cálculos ABF (Adaptative Biasing Force) para el “Lig 1” y NUCC-555, que consiste en el análisis de fuerzas electrostáticas entre la molécula de estudio y la Mstn, todo esto se realizó por triplicado para determinar la desviación estándar en el cálculo de la energía de unión absoluta, en el que para NUCC-555 fue de -4.443 ± 2.32 Kcal/mol y para “Lig 1” de -10.43 ± 1.13 Kcal/mol como se muestra en la Figura 16. Se utilizó el programa NAMD <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, usando los clústeres OLINKA (Universidad Autónoma del Estado de México) y Xiuhcoatl (CINVESTAV).

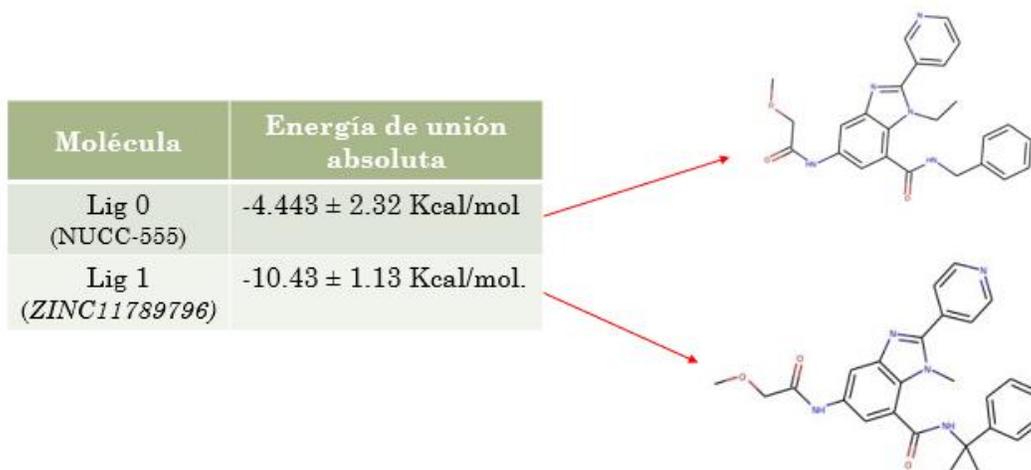


Figura 16. Energía de unión libre absoluta a Mstn verificada por triplicado para cada ligando.

Así mismo se determinó el sitio de unión a Mstn de ambos ligandos y las interacciones para cada caso individual. Como se muestra en la Figura 17A, NUCC-555 se estabiliza mediante una unión pi-H con la Isoleucina 32 y mediante una interacción pi-pi con el Triptófano 31 de la Mstn, con una energía de unión de -0.7 y -0.01 Kcal/mol para cada interacción respectivamente. Por su parte, como se muestra en la Figura 17B el “Lig 1” se estabiliza con las interacciones tipo puente de hidrogeno con la Serina 44 y la Alanina 70, con una energía de -0.9 y -0.5 Kcal/mol respectivamente, y mediante una interacción tipo pi-H con la leucina 20 con una energía de -2.4 Kcal/mol.

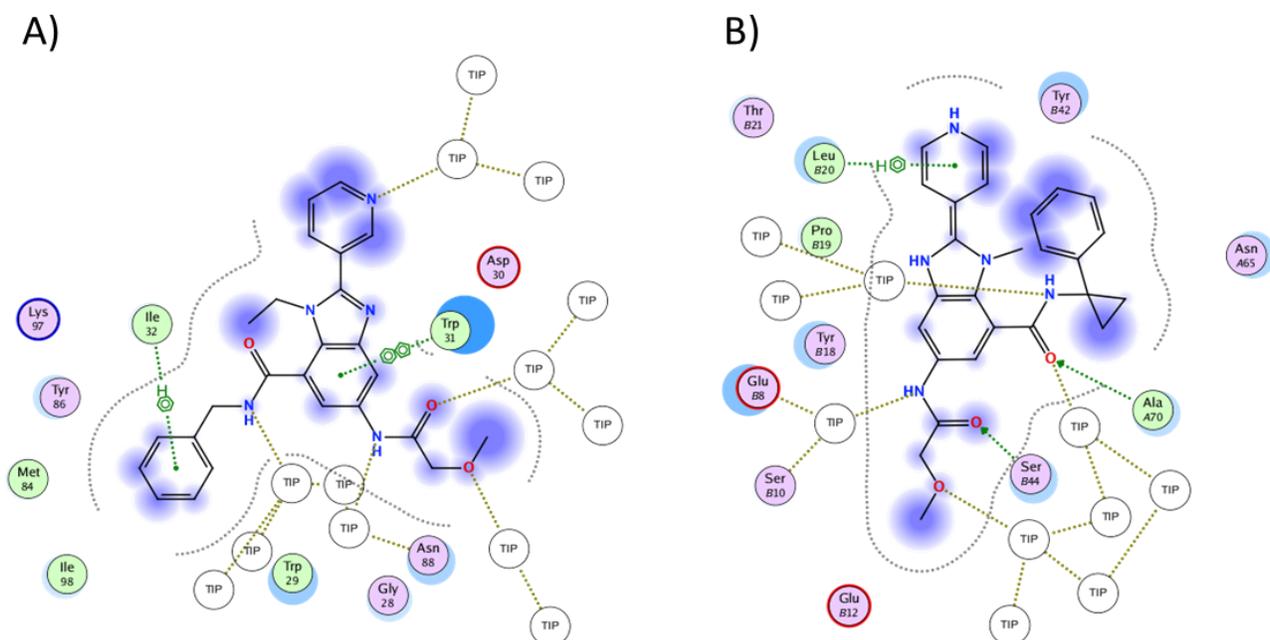


Figura 17. Esquema representativo de las interacciones que mantienen, A) Lig 0 (NUCC-555) y B) “Lig 1” (ZINC11789796), con Mstn y con el solvente. **A)** (“Lig 0” (NUCC-555): se estabiliza mediante una unión pi-H con una Ile-32 y mediante una interacción pi-pi con el Trp-31 de la Mstn, con una ΔG de unión de -0.7 y -0.01 Kcal/mol respectivamente); **B)** (“Lig 1” (ZINC11789796): se estabiliza con las interacciones tipo puente de hidrogeno con Ser-44 y Ala-70 con una ΔG de -0.9 y -0.5 Kcal/mol respectivamente, y con una interacción tipo pi-H con la Leu-20 con una ΔG de -2.4 Kcal/mol). Tomado de NAMD

<https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

En conclusión, la serie de análisis realizados nos permitieron determinar que se logró identificar y caracterizar *in-silico* a la molécula “

“Lig 1” (ZINC11789796) como candidata inhibidora de la proteína Mstn. Así mismo se observó que “Lig 1” (ZINC11789796) tiene un mejor coeficiente de probabilidad de unión (Específico) a Mstn (0.95) comparado con el de Lig 0 (NUCC-555) (0.36). finalmente se logró obtener los valores de energía de unión absoluta de la molécula “Lig 1” (ZINC11789796) y se observó que eran muy favorables para la estabilidad del complejo Proteína-Ligando -10.43 Kcal/mol.

Análisis del efecto del “Lig 1 “sobre la diferenciación de las células C2C12.

2.a Análisis de la toxicidad celular del Ligando 1

Con el objetivo de conocer si el Ligando 1 (“Lig 1”) tiene un efecto adverso sobre la viabilidad celular en cultivos C2C12, se realizó un análisis de toxicidad. Este consistió en el cultivo de 100,000 células en medio de crecimiento DMEM con 10% de SFB, en presencia de “Lig 1 “a [25µM] o DMSO. Después de 48 h, se determinó el número total de células para cada condición experimental, como se observa en la Figura 18. Así mismo en este primer análisis se determinó la solubilidad del “Lig 1” que fue total en DMSO.

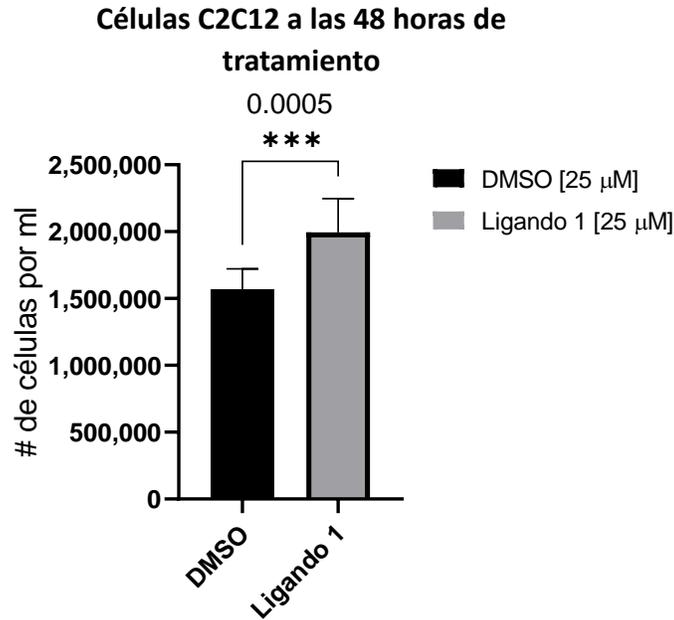


Figura 18. Mioblastos C2C12 de ratón cultivados en Medio DMEM c/SFB 10% durante 48 horas con tratamiento con el “Lig 1”. Análisis t-test, valor P=0.0005 n=6.

2.b Cultivo, diferenciación y tratamiento de células C2C12 (Mioblastos) con “Ligando 1”

Una vez teniendo satisfactoriamente el resultado de toxicidad, donde se observó que no solo no afectó la viabilidad celular, sino que promovió la proliferación celular. A partir de esa observación se decidió continuar con el análisis de diferenciación *in-vitro*. Para eso se descongeló de -80°C un criovial de células de ratón C2C12 (Pase 5) con el objetivo de expandirlas en placas de cultivo de 10mm x 20mm y se mantuvieron a una confluencia de 30–40 % para su crecimiento.

Una vez alcanzando el número de 2.5 millones de mioblastos C2C12 mediante conteo manual en cámara de Neubauer, se procedió a sembrar por duplicado 200,000 células para cada concentración a utilizar. El sembrado se realizó en una caja de 6 pozos, utilizando 200,000 células por pozo, con el objetivo de lograr una confluencia del 80% a las 24 horas de sembrado (Figura 19). Después de 5 horas post-cultivo para su adhesión a la placa de cultivo, se dio inicio al tratamiento con el “Lig 1” por duplicado, empleando 3 concentraciones diferentes, las cuales fueron [12 μ M], [25 μ M] y [50 μ M]. Así mismo se sembraron simultáneamente células tratadas con DMSO como control, bajo las mismas condiciones (Tabla 5).

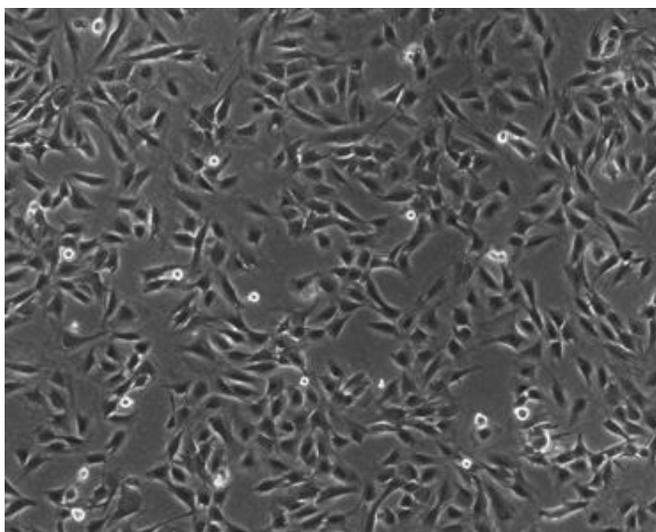


Figura 19. Mioblastos C2C12 de ratón en confluencia del 80%, cultivados en Medio DMEM c/SFB 10%
Foto a 40X Tomada con *NIS-Elements Nikon*.

Tratamiento	Concentración final en 2 ml cultivo	Medio de Crecimiento
(Lig 1) ZINC11789796	12 μ M	DMEM c/10% SFB
	25 μ M	
	50 μ M	
Tratamiento control	Concentración final en 2ml cultivo	Medio de Crecimiento
DMSO	12 μ M	DMEM c/10% SFB
	25 μ M	
	50 μ M	

Tabla 5. Tratamiento a diferentes concentraciones con el “Ligando 1” y “DMSO” en Mioblastos C2C12 de ratón, cultivados en Medio de crecimiento DMEM c/SFB 10% respectivamente.

Posteriormente al llegar al 80% de confluencia, se dio inicio la inducción de la diferenciación, esto manteniendo el tratamiento con el “Lig 1” y DMSO (Tabla 6). Finalmente se dejaron diferenciar por 72 h y se fueron monitoreando y observando los cambios morfológicos hasta su cosecha.

Tratamiento	Concentración final en 2 ml cultivo	Medio de Diferenciación
(Lig 1) ZINC11789796	12 μ M	DMEM c/2% SC
	25 μ M	
	50 μ M	
Tratamiento control	Concentración final en 2ml cultivo	Medio de Diferenciación
DMSO	12 μ M	DMEM c/2% SC
	25 μ M	
	50 μ M	

Tabla 6. Tratamiento a diferentes concentraciones con el “Ligando 1” y “DMSO” de mioblastos C2C12 de ratón cultivados en medio de diferenciación DMEM c/SC 2% respectivamente.

2.c Determinación de cambios en la diferenciación de células C2C12, a nivel morfológico en presencia del Ligando 1

Pasando las 72 horas de diferenciación se continuó con su análisis mediante microscopía óptica registrando los “cambios morfológicos” en los miotubos observados, considerando el calibre de los miotubos y su longitud, todo esto con las diferentes concentraciones de tratamiento, los cuales se muestran en la Figura 20.

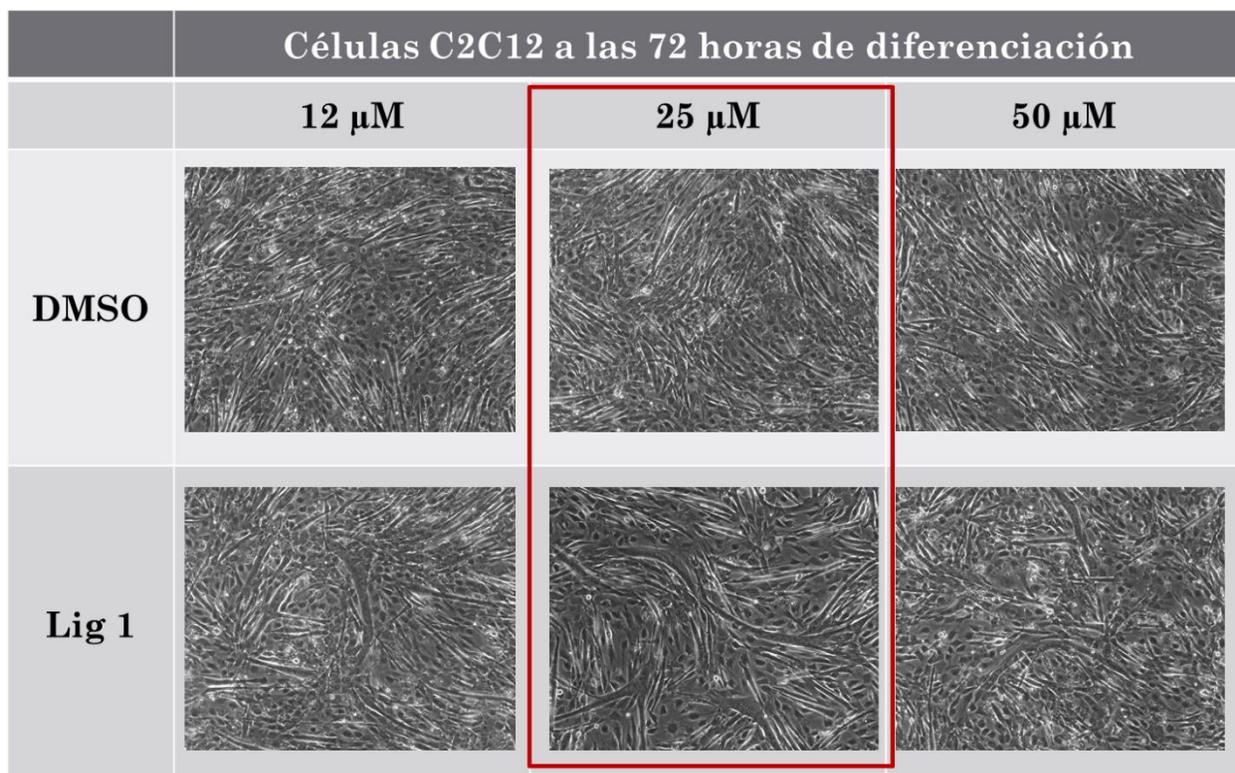


Figura 20. Tratamiento de Mioblastos C2C12 a diferentes concentraciones ([12 μM], [25 μM] y [50 μM]) del “Ligando 1” y de [12 μM], [25 μM] y [50 μM] con “DMSO” como control). En rojo se observa que a concentración de [25 μM] hay mucho mejor “cambio morfológico” respecto a su control y respecto a sus otras concentraciones, debido a que los miotubos observados son de mayor calibre, así como de mayor longitud.

Foto a 40X Tomada con *NIS-Elements Nikon*.

Con base en los resultados observados a nivel microscópico en el punto anterior, se decidió utilizar la concentración de [25 μM] con “Lig 1” como tratamiento para el siguiente análisis, ya que fue la concentración a la que se observaron los cambios morfológicos más evidentes con respecto a su control (Figura 20).

A sí mismo para continuar con el análisis, se cultivaron por duplicado 200,000 células para cada tiempo a analizar, fueron cultivadas en medio de crecimiento DMEM con 10% de SFB, posteriormente se dejaron sin manipular 5 horas, para su adhesión a la placa de cultivo, pasado ese tiempo se dio inicio al tratamiento a [25 μ M] con “Lig 1” y DMSO como control, posteriormente al llegar al 80% de confluencia celular, se dio inicio la inducción de la diferenciación, esto manteniendo el tratamiento con el “Lig 1” y DMSO , finalmente fueron cosechadas a diferentes tiempos de diferenciación, los cuales fueron, 0 h, 24 h y 72 h como se muestra en la Figura 21.

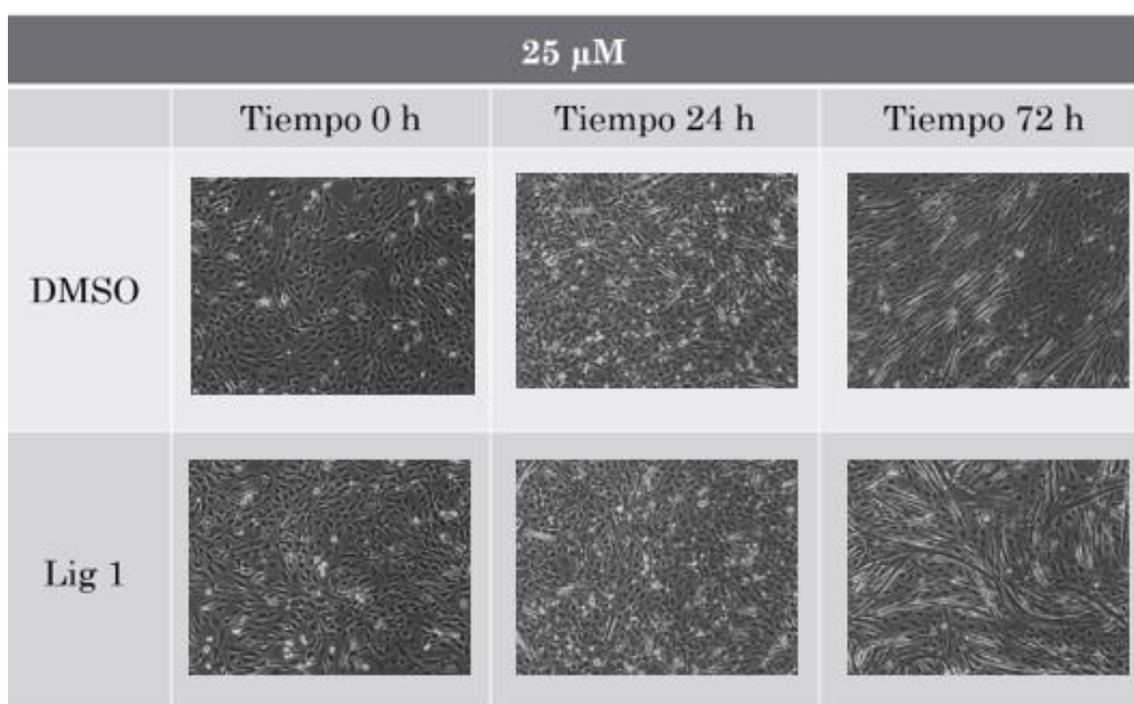


Figura 21. Tratamiento de Mioblastos C2C12 con “Lig 1” [25 μ M] y DMSO [25 μ M] como control a diferentes tiempos de diferenciación. Foto a 40X Tomada con *NIS-Elements Nikon*.

Posteriormente se hizo un análisis a las 72 horas del área de los miotubos ya diferenciados mediante el software FIJI (ImageJ), en el que se puede observar cómo efectivamente hay un incremento significativo en el área promedio de los miotubos tratados con “Lig 1” [25 μ M] comparado con su control DMSO [25 μ M], indicando morfológicamente el efecto positivo del “Lig 1” sobre la diferenciación musculo esquelética. (Figura 22).

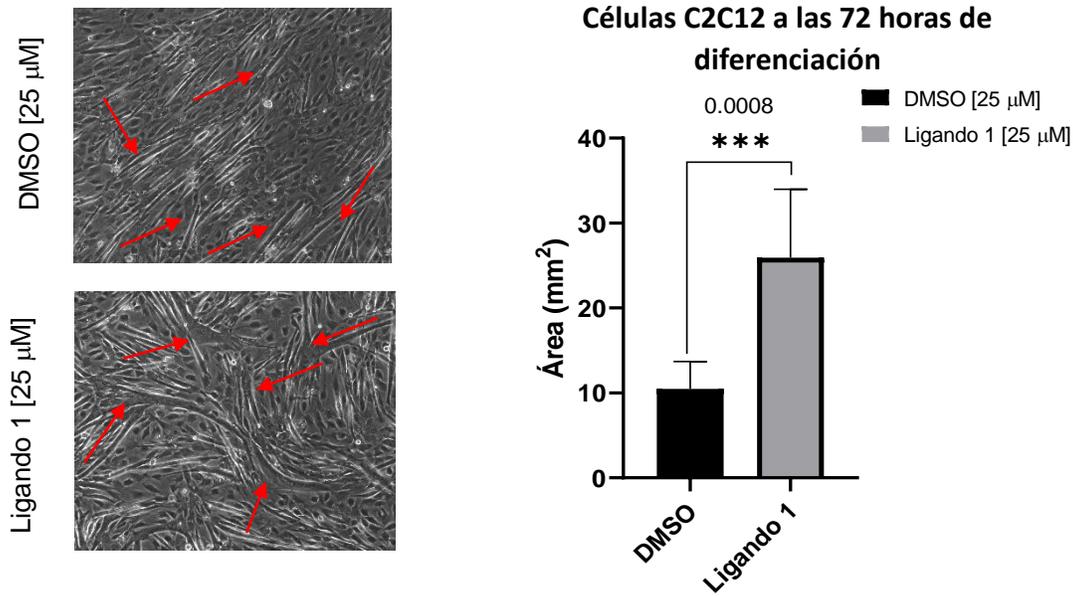


Figura 22. Medición del área promedio de Miotubos en cultivo a las 72 horas de diferenciación en presencia del “Lig 1” [25 μM] y DMSO [25 μM] como control, las flechas en rojo indican los 5 Miotubos más representativos de cada muestra. n=3/duplicado. Gráfica hecha con *Graphpad Prism 8* y Fotos tomadas a 40X con *NIS-Elements Nikon* y analizadas por *Fiji-ImageJ*.

Análisis del efecto del Ligando 1 sobre la expresión de marcadores de la diferenciación muscular.

Posteriormente para evaluar si realmente esos efectos observados a nivel morfológico generaron un cambio de expresión en los genes de la diferenciación, se cosecharon todos los tiempos de diferenciación (los cuales fueron, 0 h, 24 h y 72 h) para su extracción de RNA y seguir su análisis por RT-qPCR. en el que consistió en determinar los niveles de expresión de los genes marcadores del programa de diferenciación muscular.

Para ello se realizó la extracción de RNA total de las células diferenciadas durante 0, 24 y 72 horas, tanto para las tratadas como las no tratadas, se hizo la cuantificación mediante espectrofotometría (*Nanodrop-2000*) de todas las muestras y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 23).

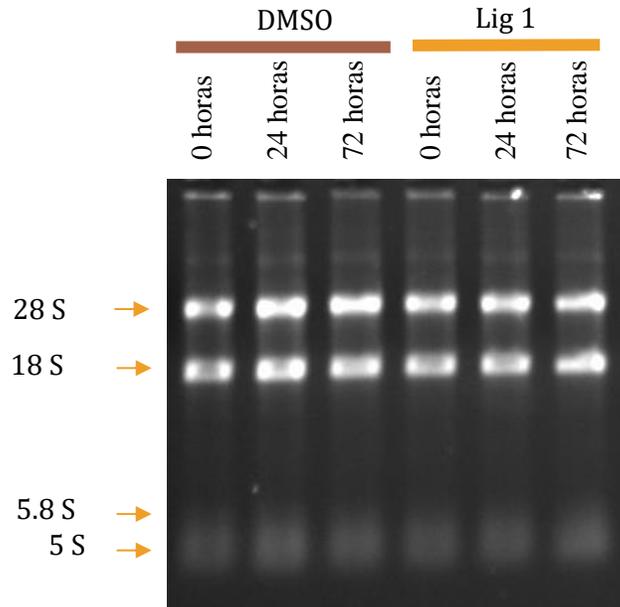


Figura 23. RNA total de células C2C12 a diferentes tiempos de diferenciación, tratadas con “Lig 1” [25 μ M] y con DMSO [25 μ M] como control, aproximadamente se cargaron 500 ng de muestra para cada pozo.

Tomada de *ImageLab*

Después de cuantificar y verificar la integridad del RNA total, se utilizó 1 μ g de RNA para la obtención de cDNA de cada muestra. Con el objetivo de determinar que los oligonucleótidos empleados, generaran un solo producto del tamaño esperado, se realizó PCR de punto final para los genes: Miogenina, MHCII_B, MHC_I, MyoD y RSP18 como gen constitutivo (Figura 24). Al mismo tiempo se determinó que la calidad del cDNA obtenido fuera adecuado para los análisis subsecuentes

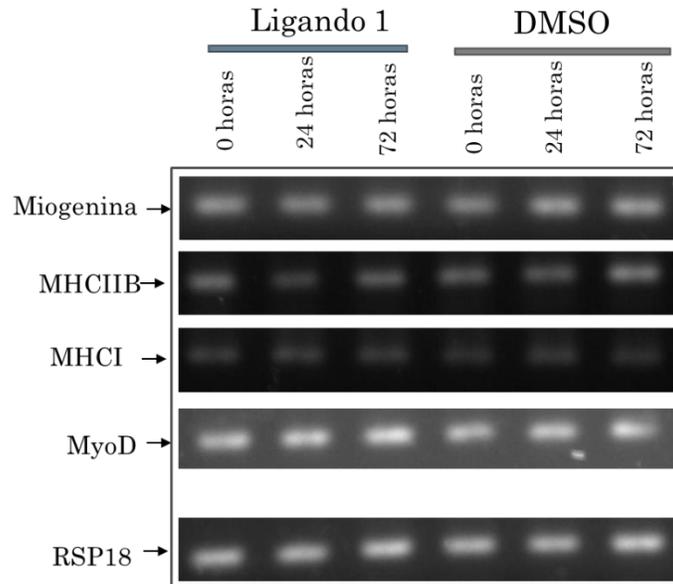


Figura 24. RT-PCR punto final de los genes involucrados en la diferenciación muscular a diferentes tiempos de diferenciación con Ligando 1 [25 μ M] y DMSO [25 μ M] como control. Tomada de *ImageLab*

Posterior a verificar que nuestra muestra, así como nuestros oligonucleótidos eran de buena calidad, se decidió realizar la cuantificación de los niveles de expresión, mediante RT-qPCR de los genes involucrados en la diferenciación, en cultivos tratados con [25 μ M] del Ligando 1, Evaluando a las 0h, 24h y 72 h de diferenciación los mismos genes utilizados en el punto anterior los cuales fueron: y RSP18 como gen constitutivo.

A continuación, se muestran las gráficas de expresión de los genes de la diferenciación muscular a diferentes tiempos, donde se puede apreciar que a las 72 horas de diferenciación hay un aumento significativo de los niveles de expresión de MyoG y MHCIIB comparado con su control. Sin embargo, con los genes MyoD y MHCI, no se logra apreciar un cambio significativo respecto a su control, así como tampoco se observó en ninguno de los genes analizados un cambio significativo a tiempos de diferenciación tempranos (0h y 24h). (Figura 25)

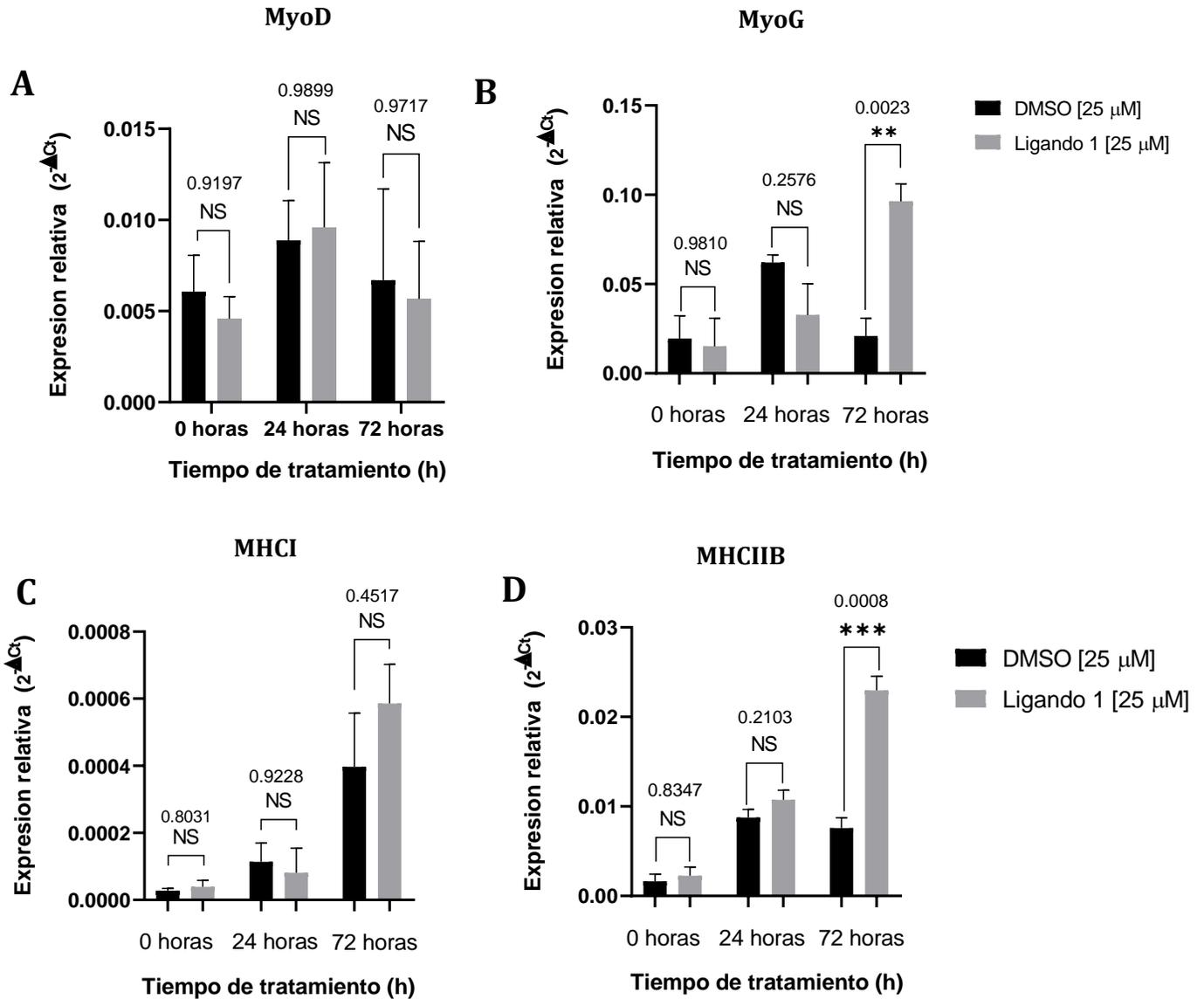


Figura 25. RT-qPCR de A) MyoD, B) MyoG, C) MHC I y D) MHC IIB, n=3 / Duplicado. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=6) con análisis estadístico ANOVA de dos vías. $P < 0.05$ respecto al control.

Posteriormente se hizo el análisis del perfil de expresión del tipo de fibras MHC I y MHC IIB en cultivos tratados con “Lig 1” donde se puede apreciar el patrón de incremento de MHC I a las 72 h en condiciones normales y el decremento de MHC IIB a 72 h. Sin embargo, en cultivos tratados con “Lig 1” se puede observar que para ambos genes (MHC I y MHC IIB) existe un incremento de expresión a las 72 horas de diferenciación como se muestra en la Figura 26.

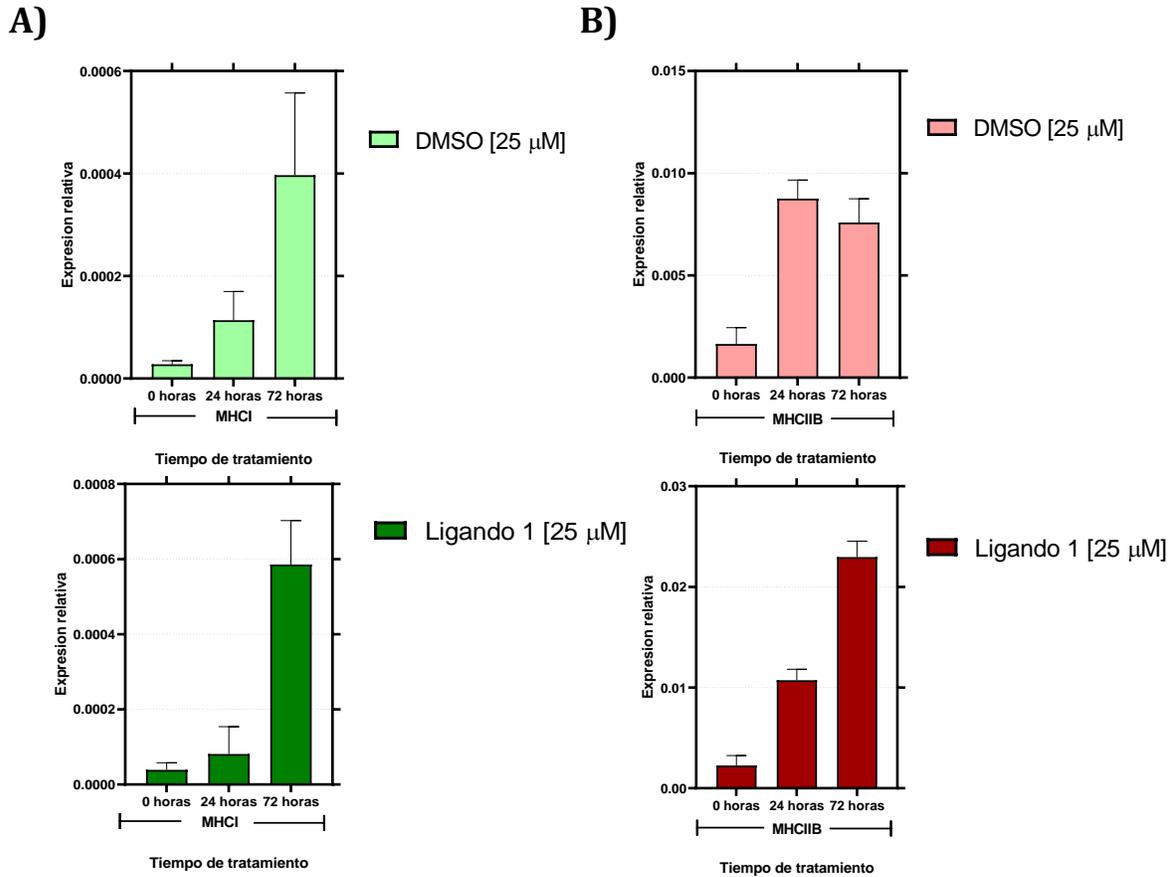


Figura 26. Perfil de expresión de Fibras **A) MHCI** y **B) MHCII B** en cultivos tratados con “Lig 1” y DMSO como control. n=3 / Duplicado

De forma conclusiva se logró identificar *in-silico* moléculas con potencial de inhibición a la proteína Mstn, de las cuales se escogió la que mejor score obtuvo, la cual fue “Lig 1”. Así mismo se logró comprobar la actividad biológica de “Lig 1” en un sistema *in-vitro* de diferenciación, el cual resultó en un efecto positivo y de manera significativa se observó un incremento en el calibre, en la longitud y en el área de los miotubos tratados, dándonos la oportunidad de continuar y verificar que estos cambios también se estuviesen dando a nivel molecular. De esta forma se logró observar que el “Lig 1”, pudo ejercer un efecto positivo en la expresión de marcadores de la diferenciación muscular de las células C2C12 de ratón. Se puede observar que con todos estos resultados “Lig 1” tiene efectos regulatorios positivos en el programa de diferenciación muscular con tratamientos a tiempos largos comparado con tratamientos a cortos y son prometedores para analizar y abordar otro tipos de genes involucrados en el mecanismo molecular de la Mstn.

DISCUSION DE RESULTADOS

Actualmente, están en avance las estrategias de la regulación del desarrollo de varios tejidos, entre ellos, el tejido muscular a nivel genético y epigenético. Estos avances se han llevado a cabo gracias a la identificación de elementos regulatorios que pueden ir desde, factores de transcripción, hasta fármacos, entre otras nuevas moléculas. A lo largo de los años se han ido identificando como candidatas terapéuticas para afecciones secundarias a enfermedades primarias, donde el desenlace de un gran número de enfermedades termina siendo el hacinamiento en cama y la subsecuente degradación de tejidos, como el músculo esquelético.

Actualmente son muy pocos los mecanismos de regulación del desarrollo muscular que se han podido conocer en su totalidad, incluso se piensa que puede haber más de una red de regulación tanto a nivel estructural involucrando el destino celular de las células satélite y su localización a lo largo del tejido. En el caso de los MRFs que en conjunto con la familia de los TGF- β s, el conocimiento de sus interacciones y su función aún es limitada.

En estos últimos años se ha podido dilucidar tanto a nivel transcripcional como traduccional los efectos de la expresión de la Mstn, un miembro de la familia de TGF- β expresado casi exclusivamente en tejido músculo esquelético [48,49,50], esto confiriendo un mejor control sobre los hallazgos. Por otro lado, se ha visto que se puede inhibir el efecto de Mstn a diferentes niveles, donde cada nivel repercute de manera diferente a la regulación del desarrollo muscular. Varios autores han propuesto la inhibición del receptor de Mstn, sin embargo, a este nivel el receptor ActRIIB no está expresado únicamente en musculo, eso lleva a pensar que su inhibición podría generar efectos secundarios no deseados, volviéndolo a este tipo de inhibiciones inespecíficas.

En otros estudios el planteamiento se ha enfocado en inhibir mediante el uso de anticuerpos a la Mstn, sin embargo, ésta al pertenecer a una gran familia de ligandos, que estructuralmente son muy parecidos y conservados entre sí, han generado inhibiciones poco específicas. Así mismo, al ser productos biológicos proteicos, estos son capaces de sufrir una degradación *in-vivo* de manera rápida, comparada con moléculas sintéticas.[51] Aunado a esto se suma el hecho de las reacciones adversas inmunológicas que podría conllevar el introducir una proteína extraña a un organismo diferente [51].

A lo largo de los años la medicina ha evolucionado al punto de tener terapias personalizadas y de manera específicas. Para lo cual se busca la utilización de nuevas metodologías *in-silico* que nos permitan ahorrar recursos en ensayos *in-vitro*, así como tiempo en años de desarrollo. Todo esto nos permite conocer blancos de interacción en tiempos más cortos y así poder avanzar a estadios de investigación más desarrollados. Tomando como base, estudios teóricos generados a partir de bases de datos y cálculos matemáticos tanto como estadísticos para determinar la fiabilidad del estudio.

De igual forma a lo largo de estos años las nuevas estrategias que van surgiendo como la de Zhu y colaboradores en 2015 [41], nos demuestran el gran potencial de las herramientas bioinformáticas para extraer moléculas y compuestos de interés terapéutico. Como podemos ver NUCC-555 fue capaz de lograr una inhibición específica y dosis dependiente a Activina, sin embargo, aunado a eso se observó en este mismo estudio que NUCC-555 podría lograr una inhibición secundaria y no específica a Mstn lo que nos llevó a tomarla como molécula de partida ya que, a pesar de su inespecificidad y el hecho de no estar comercialmente disponible, nos centramos en las ventajas que tenía, siendo de las más importantes la citotoxicidad, la solubilidad. ya que fueron prometedoras para buscar ahora más especificidad.

En este trabajo tomamos como molécula modelo a NUCC-555 y partiendo de ella nos planteamos identificar y caracterizar *in-silico* moléculas candidatas inhibidoras de la Mstn, obtenidas a través de modelaje molecular, siendo capaces de seguir rigurosamente la selección de dichas moléculas candidatas, mediante programas que nos permitieron darle el enfoque específico y preciso que se buscaba, que fue inhibir la función de Mstn con una alta especificidad, siendo de dicha importancia en esta trabajo la exclusión de moléculas de baja afinidad que pudiesen estar generando una unión secundaria no deseada.

En nuestros resultados lo que se pudo extraer fue que, efectivamente se identificó de entre un banco molecular de 10.6 millones de moléculas a 110 de ellas que lograron obtener una alta similitud química con NUCC-555, posterior a eso la refinación del análisis desenlazó en 9 moléculas candidatas como moléculas de estudio, y utilizando como NUCC-555 de referencia se partió para hacer los cálculos de probabilidad de unión, así como los de la simulación de interacción. Sin embargo, como nuestro análisis consistió de un enfoque de

especificidad alta, se siguió en refinaciones aún más finas, en donde se logró obtener 2 moléculas de mayor interés, así como de mejor ranking en probabilidad de unión y estabilidad de unión a Mstn. Esto nos da ventaja sobre estrategias de otros autores, donde su especificidad es baja debido a que sus inhibidores logran unión con otros integrantes de la familia de los TGF- β [52,53,54].

La importancia de este estudio fue que logró llegar al análisis *in-vitro* del “Lig 1” que fue nuestra molécula que obtuvo mayor probabilidad de unión, así como una mayor estabilidad de unión. De primera instancia los análisis nos arrojan que “Lig 1” no ejerció un efecto toxico en cultivo, observando que no solo no es toxico sino que incrementa la proliferación significativamente con un valor $P=0.0005$, esto nos indica que posiblemente “Lig 1” tenga una relación positiva con el ciclo celular, regulando deseosamente a la baja la cascada de señalización de Mstn y logrando así que las células escapen de la fase G1, donde en esta fase es donde Mstn ejerce su efecto, a través del incremento de las concentraciones de P21, desencadenando en la detención del ciclo celular.[55,56]

Posterior a esa observación, al realizar el cultivo en mioblastos con presencia del “Lig 1”.se pudo apreciar un cambio morfológico exitoso a nivel estructural en los cultivos tratados durante 72 horas con el compuesto, comparado con los cultivos control, así mismo, entre los cultivos tratados con “Lig 1” el que mejor efecto causó en las células a nivel diferencial fue el que se realizó a una concentración de $[25\mu\text{M}]$, siendo capaces de hipotetizar que el tratamiento a altas dosis generan efectos no deseados. En contraparte a $[25\mu\text{M}]$ el incremento en la efectividad de la diferenciación musculo esquelética es evidente, debido a que se observó un incremento en el número de miotubos diferenciados, así como en el calibre de estos mismos, siendo un efecto favorable para los cultivos tratados con el “Lig 1”. Corroborando la alta especificidad del compuesto al requerir de dosis bajas para lograr su efecto esperado.

Para hacer de las observaciones un número absoluto que fuese capaz de arrojar información cuantificable, al hacer la evaluación del área promedio (En el software FIJI) de los Miotubos a las 72 horas de diferenciación con tratamiento con “Lig 1”, pudimos observar que efectivamente hay un incremento significativo en el tamaño de los miotubos a las 72 horas, con un valor de $P=0.0008$, dándonos a pensar en que posiblemente “Lig 1” ejerza un

efecto positivo en la hipertrofia muscular, así llevándonos a la pregunta que sí; ¿Realmente el compuesto pudiese estar generando un incremento a nivel transcripcional los tipos de miofibras de contracción rápida comparado con el tratamiento control?.

Una vez establecida la concentración a utilizar y el tiempo de tratamiento para el cual usar el “Lig 1” en cultivo, en una curva de diferenciación de 72 horas, se aprecia que con el análisis de la expresión de los genes de la diferenciación muscular (Mediante RT-qPCR) de los miotubos C2C12, los genes que sufrieron un cambio significativo fueron solo MyoG y MHCIIIB comparado con MyoD y MHCI, sugiriendo que “Lig 1” tiene un efecto positivo sobre las fibras tipo rápidas, con un valor $P=0.0008$, en comparación del efecto que tiene sobre las fibras de contracción lentas, donde no se observó ningún efecto. Así mismo se puede observar que “Lig 1” tiene un efecto regulador positivo sobre la expresión de MyoG a las 72 horas de tratamiento, con un valor $P=0.0023$, esto sugiere que actúa como promotor de los genes de diferenciación terminal [57,58] y por ello de igual forma se aprecia en tratamientos a largo plazo, indicando que MyoG previene que la diferenciación muscular se detenga, induciendo a los miotubos continuar con el desarrollo hacia fibras maduras y estas de mayor calibre[58], así como promoviendo la diferenciación terminal y el desarrollo hipertrófico [58].

A nivel transcripcional, la Mstn regula positivamente las isoformas de Miosina lentas, pero negativamente las rápidas. La Mstn se expresa en altos niveles en mioblastos y fibras del músculo rápido en comparación de su contraparte el músculo lento. Un Knockout de Mstn dirige un cambio hacia las isoformas rápidas de miosina, esto sugiere un rol inhibitorio de la Mstn en la expresión de isoformas de miosina rápida [59,60,61].

Así mismo se observa que las fibras rápidas tipo II son fibras de mayor tamaño y con capacidad de una contracción rápida, su desarrollo de fuerza es de 3–5 veces mayor que las fibras de contracción lenta y tienen alta capacidad glucolítica en comparación con la actividad oxidativa de las fibras lentas, Las Fibras rápidas se reclutan solo cuando se requiere un esfuerzo muy rápido y muy intenso en contraste con las fibras lentas tipo I que tienen mayor resistencia a la fatiga y que se requieren en movimientos repetitivos y de poca intensidad. [62,63] (Tabla 9).

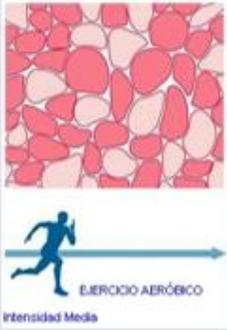
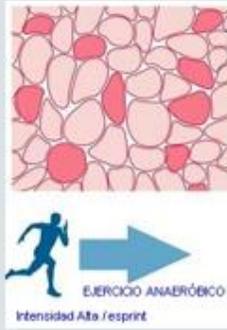
	Contracción lenta Tipo I	Contracción rápida Tipo II
Cadena pesada de Miosina	MHCI	MHCIIB
Metabolismo	Oxidativo	Glucolítico
Contenido Mitocondrial	Alto	Bajo
Resistencia a la Fatiga	Alta	Baja
Contenido de Fibras y su funcionamiento		

Tabla 7. Tipos de fibras y su funcionamiento en el musculo esquelético. Modificada de Talbot et al., 2016

Nuestros resultados muestran que el “Lig 1” tiene efectos con tratamientos a tiempos largos comparado con tratamientos a corto plazo, tanto para MyoG y MHCIIB. Sin embargo, parece ser que la regulación de MyoD no está siendo afectada directamente, de manera significativa por el “Lig 1”, generando como hipótesis que es debido a la posible disminución de Mstn disponible por la inhibición de parte de “Lig 1” [64,65] En contra parte la regulación de MHCI no está dada por Mstn, siendo esta proteína de expresión mayoritaria en fibras rápidas, que en comparación esta proteína estaría promoviendo el desarrollo de fibras lentas (MHCI) [66,67,61].

Aunado a eso se puede observar únicamente los cambios a las 72 horas, esto sugiriendo que este tratamiento podría ser acumulativo y su efecto positivo regulatorio en el programa de diferenciación muscular, lo que está ejerciendo a tiempos largos comparado con el efecto a tiempos cortos, así como en estadios más maduros de la diferenciación.

Si bien los cambios observados en este estudio son solo el comienzo de una nueva línea de investigación, permitiendo abrir el campo a nuevas metodologías sobre como ejercer un efecto inhibitorio en una vía o ruta metabólica de estudio.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudio abre puertas a nuevas estrategias *in-silico* basadas en identificar nuevas moléculas con potencial terapéutico, siendo como una nueva tecnología de implementación en áreas como la medicina personalizada, así como en medicina específica donde podremos encontrar como punto importante la generación de los menores efectos adversos, así como los menores efectos secundarios en el uso de estas terapias.

Así mismo en este estudio se tiene como perspectiva poder identificar que nuestra molécula candidata “Ligando 1” pueda ejercer su efecto inhibitorio de la vía de la Mstn que fue lo que se planteó de manera inicial, suponiendo que la proteína Mstn esté involucrada en los cambios fenotípicos que observamos de manera *in-vitro*.

Se piensa dilucidar el mecanismo de inhibición y proponer nuevas estrategias que sean capaces de analizar la misma vía; Incluso poder lograr que este tipo de terapias lleguen a fases preclínicas y en un futuro a fases clínicas donde su aplicación podría estar involucrada a diferentes niveles. Permitiendo a futuro tratamientos farmacológicos con alta exactitud y alta precisión para el tejido muscular, incluso con bajos efectos secundarios hacia otros órganos.

CONCLUSIONES

- Se logró identificar y caracterizar *in-silico* a la molécula “Lig 1” (ZINC11789796) como candidata inhibidora de la proteína Mstn.
- Se observó que “Lig 1” (ZINC11789796) tiene un mejor coeficiente de probabilidad de unión (Específico) a Mstn 0.95 comparado con el de Lig 0. (NUCC-555) 0.36.
- Se logró obtener los valores de energía de unión absoluta de la molécula “Lig 1” (ZINC11789796) y se observó que eran muy favorables para la estabilidad del complejo Proteína-Ligando -10.43 Kcal/mol.
- Se pudo observar que “Lig 1” tiene un efecto positivo en la diferenciación muscular a nivel morfológico.
- Se puede observar que “Lig 1” tiene un efecto regulador positivo sobre la expresión de Miogenina (MyoG) a las 72 horas de tratamiento.
- Se observó que “Lig 1” tiene un efecto regulatorio positivo en MHCIIB comparado con MHCI.
- Se observó “Lig 1” “favorece el desarrollo de las fibras rápidas y no causa ningún efecto sobre las fibras lentas.
- Se observó que “Lig 1” tiene efectos positivos regulatorios en el programa de diferenciación muscular con tratamientos a tiempos largos comparado con tratamientos a corto plazo.

REFERENCIAS

1. Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL. Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(10):2333-2347.
2. Egan, B., and Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013; 17, 162–184
3. Evans WJ. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010; 91:1123S–7S.
4. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol* 1961; 9: 493–495.
5. Van Velthoven CTJ, Rando TA. Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling. *Cell Stem Cell*. 2019; 24(2):213-225.
6. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000;102(6):777-86.
7. Chang, N. C., and Rudnicki, M. A. Satellite cells: The architects of skeletal muscle. *Curr. Top. Dev. Biol*. 2014; 107: 161–181.
8. Montarras D, L'honoré A, Buckingham M. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J*. 2013;280(17):4036-50
9. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. 2007; 129(5):999-1010.
10. Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*. 2011; 138(17):3647-56.
11. Buckingham M, Rigby P.W.J. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control Myogenesis, *Dev. Cell* 2014; 28: 225–238.
12. Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, Olwin BB. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* 2007;177(5):769-779.
13. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(2): a008342.
14. Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL. Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(10):2333-2347.
15. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor beta-Like Signaling Pathway to Block Adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2003; 23:7230- 242

16. Rodgers, B.D. y Garikipati, D.K. *Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. Endocrine Reviews* 2008; 29(5):513–534.
17. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, et al. *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science.* 2001; 294(5547):1704–1708.
18. Pickering WP, Price SR, Bircher G, Marinovic AC, Mitch WE, Walls J. *Nutrition in CAPD: serum bicarbonate and the ubiquitin-proteasome system in muscle. Kidney Int* 2002; 61(4):1286–1292.
19. Garikipati DK, Gahr SA, Roalson EH, Rodgers BD. *Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic organization, differential expression, and pseudogenization. Endocrinology* 2007; 148(5):2106-2115.
20. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. Nature* 1997; 387:83–90.
21. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. *Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res* 1997; 7:910–916
22. McPherron AC, Lee SJ. *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12457–12461
23. Sharma, M., R. Kambadur, et al. *Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. J Cell Physiol* 1999; 180(1): 1-9.
24. McKoy, G., K. A. Bicknell, et al. *Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. Cardiovasc Res* 2007; 74(2): 304-12.
25. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. *Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. Am J Physiol* 1999; 277: R601-R606
26. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. *Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(10):2191-2199.
27. Spiller, M. P., R. Kambadur, et al. *The myostatin gene is a downstream target gene of basic Helix-Loop-Helix transcription factor MyoD. Mol Cell Biol* 2002; 22(20):7066-82.
28. Allen, D. L. and T. G. Unterman. *Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1): C188-99.
29. Deveaux V, Picard B, Bouley J, Cassar-Malek I. *Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in-vitro. Reprod Nutr Dev* 2003; 43:527- 542
30. Lee SJ, McPherron AC. *Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9306-9311.

31. Zamora, E., Galán, A., & Simó, R. *Papel de la miostatina en la afectación muscular asociada a las enfermedades crónicas. Medicina Clínica* 2008; 131(15), 585–590.
32. Wang M, Yu H, Kim YS, Bidwell CA, Kuang S. *Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 426(1):83-88.
33. Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J. L., Celeste, A. J., y Attisano L. *Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. Mol Cell Biol* 2003; 23(20): 7230-42.
34. Jayaraman L, Massague J. *Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. J Biol Chem* 2000; 275:40710-40717
35. Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL. *Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. Cytokine* 2004; 26:262-272
36. Forbes D, Jackman M, Bishop A, Thomas M, Kambadur R, Sharma M. *Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. J Cell Physiol* 2006; 206:264-272
37. Harrison, C. A., Gray, P. C., Fischer, W. H., Donaldson, C., Choe, S., & Vale, W. *An Activin Mutant with Disrupted ALK4 Binding Blocks Signaling via Type II Receptors. Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(27), 28036-28044.
38. Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. *Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. J Biol Chem.* 2008;283(28):19371-19378.
39. Horbelt, D., Boergermann, J. H., Chaikuad, A., Alfano, I., Williams, E., Lukonin, I., Knaus, P. *Small Molecules Dorsomorphin and LDN-193189 Inhibit Myostatin/GDF8 Signaling and Promote Functional Myoblast Differentiation. Journal of Biological Chemistry* 2014; 290(6), 3390–3404.
40. Sartori, R., Schirwis, E., Blaauw, B., Bortolanza, S., Zhao, J., Enzo, E., Stantzou, A., Mouisel, E., Toniolo, L., Ferry, A., Stricker, S., Goldberg, A. L., Dupont, S., Piccolo, S., Amthor, H., and Sandri, M. *BMP signaling controls muscle mass. Nat. Genet* 2013; 45, 1309–1318.
41. Zhu J, Mishra RK, Schiltz GE, et al. *Virtual High-Throughput Screening to Identify Novel Activin Antagonists. J Med Chem.* 2015; 58(14):5637-5648.
42. Sanchez Montero JM. *Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results. An Real Acad Farm* 2016; 82:168-184
43. Botan, A., Favela-Rosales, F., Fuchs, P. F. J., Javanainen, M., Kanduč, M., Kulig, W., Tynkkynen, J. *Toward Atomistic Resolution Structure of Phosphatidylcholine Headgroup and Glycerol*

- Backbone at Different Ambient Conditions. Journal of Physical Chemistry* 2015; B119(49), 15075–15088.
44. Pasenkiewicz-Gierula, M., Baczynski, K., Markiewicz, M., & Murzyn, K. *Computer modelling studies of the bilayer/water interface. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 2016; 1858(10),2305–2321.
 45. Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. *Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. Educación Química* 2016; 4–11.
 46. Mouritsen, O. G., & Bagatolli, L. A. *Life — As a Matter of Fat (Second). Swirzerland: Springer International Publishing* 2016; 85.
 47. Gibbs, J.W. *A method of geometrical representation of the thermodynamic properties of substances by means of surfaces. Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences* 1873; 2, 382- 404.
 48. Yoshida T, Delafontaine P. *Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. Cells* 2020; 9(9): 1970.
 49. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. *Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. Nat Rev Drug Discov* 2015;14(1):58-74.
 50. Itoh Y, Saitoh M, Miyazawa K. *Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018; 50(1):82-90.
 51. Welsh BT, Cote SM, Meshulam D, et al. *Preclinical Safety Assessment and Toxicokinetics of Apitegromab, an Antibody Targeting Proforms of Myostatin for the Treatment of Muscle-Atrophying Disease. Int J Toxicol.* 2021;40(4):322-336.
 52. Muramatsu H, Kuramochi T, Katada H, et al. *Novel myostatin-specific antibody enhances muscle strength in muscle disease models. Sci Rep.* 2021; 11(1):2160.
 53. Omosule CL, Gremminger VL, Aguiard AM, et al. *Impact of Genetic and Pharmacologic Inhibition of Myostatin in a Murine Model of Osteogenesis Imperfecta. J Bone Miner Res.* 2021; 36(4):739-756.
 54. Barrett D, Bilic S, Chyung Y, et al. *A Randomized Phase 1 Safety, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Novel Myostatin Inhibitor Apitegromab (SRK-015): A Potential Treatment for Spinal Muscular Atrophy. Adv Ther.* 2021; 38(6):3203-3222.
 55. McFarlane C, Hui GZ, Amanda WZ, et al. *Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. Am J Physiol Cell Physiol.* 2014 Dec 15;307(12):C1154].
 56. Barbé C, Loumaye A, Lause P, Ritvos O, Thissen JP. *p21-Activated Kinase 1 Is Permissive for the Skeletal Muscle Hypertrophy Induced by Myostatin Inhibition. Front Physiol* 2021; 12:677746.

57. Chal J, Pourquié O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in-vitro. *Development*. 2017; 144(12):2104-2122.
58. Lamarche É, AlSudais H, Rajgara R, Fu D, Omaiche S, Wiper-Bergeron N. SMAD2 promotes myogenin expression and terminal myogenic differentiation. *Development*. 2021;148(3):dev195495.
59. Hennebry, C. Berry, V. Sirienn, P. O'Callaghan, L. Chau, T. Watson, M. Sharma, R. Kambadur, Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 2009; 296 C525–534.
60. Sharma M, McFarlane C, Kambadur R, Kukreti H, Bonala S, Srinivasan S. Myostatin: expanding horizons. *IUBMB Life*. 2015;67(8):589-600.
61. Baczek J, Silkiewicz M, Wojszel ZB. Myostatin as a Biomarker of Muscle Wasting and other Pathologies-State of the Art and Knowledge Gaps. *Nutrients*. 2020; 12(8):2401.
62. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles, *Physiol. Rev* 2011; 91:1447–1531.
63. Talbot, J., & Maves, L. 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* 2016; 5(4), 518-534.
64. Shenoy P S, Bose B, Sharma M, McFarlane C, Kambadur R. Lack of myostatin reduces MyoD induced myogenic potential of primary muscle fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2014; 115(11):1908-1917.
65. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem*. 2002;277(51):49831-49840.
66. Aiello D, Patel K, Lasagna E. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Anim Genet*. 2018; 49(6):505-519.
67. White TA, LeBrasseur NK. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges - a mini-review. *Gerontology*. 2014;60(4):289-293.