

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Genética y Biología molecular

**“Identificación de complejos de cromatina asociados a
elementos de regulación transcripcional de genes
implicados en el metabolismo oxidativo del músculo
esquelético de ratón, en respuesta a epicatequina”**

Tesis que presenta

Mauricio Hernández Somilleda

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Ciudad de México

Agosto, 2023

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado que me permitió llevar a cabo este proyecto en las instalaciones del Centro de Investigación del Envejecimiento perteneciente al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco al Dr. José Manuel Hernández Hernández por haber mostrado siempre interés y apertura, así como el haberme confiado este proyecto y por brindarme su apoyo durante su desarrollo.

Agradezco a los asesores el Dr. Oscar Hernández Hernández y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega por sus comentarios de retroalimentación, así como los consejos y observaciones durante cada una de sus evaluaciones.

Agradezco a la M.C. Amairani Cancino Bello por haberme apoyado y aconsejado durante los experimentos realizados en el proyecto, así como su apoyo emocional en los momentos complicados, brindándome siempre su amistad.

Agradezco a mis padres María del Carmen y Gilberto por siempre buscar mi bienestar y por permitirme continuar con mis estudios apoyándome en todo lo que necesito, sin su educación y sustento nada de esto sería posible.

Agradezco a mis abuelos María Dolores y Guillermo quienes también siempre han buscado mi bienestar y me han apoyado en mis estudios previos para poder llegar cada vez más lejos.

Contenido

Resumen	4
Summary	5
Introducción	6
1.1 Músculo esquelético	6
1.2 Células satélite	6
1.3 Diferenciación de mioblastos.....	7
1.4 Clasificación de Miofibras	8
1.5 Patologías	9
1.6 Epicatequina.....	10
1.7 Epicatequina, ejercicio y metabolismo oxidativo.....	11
1.8 Sistema CAPTURE	16
Justificación	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis	20
Metodología	21
6.1 Evaluación de la expresión de genes candidato.....	21
6.2 Diseño de los sgRNAs dirigidos hacia regiones de los genes blanco.....	24
6.3 Clonación de los sgRNA en un vector de sobre-expresión.....	25
6.4 Transducción de células C2C12 con el vector de dCas9 y sgRNA para tratarlas durante diferenciación con epicatequina	31
6.5 Confirmación de la eficiencia del sistema CAPTURE mediante geles desnaturalizantes.....	34
Resultados	40
7.1 Evaluación de la expresión de genes candidato.....	40
7.2 Diseño de los sgRNAs dirigidos hacia regiones de los genes blanco.....	44
7.3 Clonación de los sgRNA en un vector de sobre-expresión.....	46
7.4 Transducción de las células C2C12 con el vector de dCas9 y sgRNA para tratarlas durante diferenciación con epicatequina.	51
7.5 Confirmación de la eficiencia del sistema CAPTURE mediante geles desnaturalizantes.....	56
Discusión	59
Conclusiones.....	62

Perspectivas	63
Anexos	64
11. 1 Datos de qPCR	64
Bibliografía	67

Resumen

Debido a la importancia que representa el músculo esquelético para nuestra movilidad y estabilidad postural, así como el correcto funcionamiento de nuestro cuerpo, resulta importante abordar su estudio ante tratamientos que permitan reestablecer estas funciones. Recientemente se han estudiado moléculas de origen natural capaces de mejorar algunos fenotipos patológicos como las distrofias, la sarcopenia, la obesidad y diabetes. La Epicatequina, es un flavonoide que se encuentra en el cacao y té verde. Se ha reportado que el tratamiento con esta molécula tanto en modelos de estudio sanos y patológicos provoca una recuperación en la expresión de proteínas importantes para la generación de energía a partir de la fosforilación oxidativa, de igual manera se ha reportado el aumento del contenido mitocondrial en músculo esquelético con este tratamiento. Por lo que esta respuesta a Epicatequina es comparable con el fenotipo mostrado en ejercicio aeróbico agudo, donde también existe un aumento del contenido de mitocondrias y sus complejos proteicos, sin embargo, no se conoce el mecanismo a nivel molecular mediante el cual es posible que Epicatequina module la expresión de estas proteínas. En este trabajo se evaluó la expresión de 2 genes importantes en el metabolismo oxidativo del músculo esquelético, Nr4a3 y Perm1, que a su vez son modulados por el ejercicio. Se encontró por análisis cuantitativos de cultivos *in vitro* que también aumentan su expresión en células musculares diferenciadas tratadas con Epicatequina. Por lo que se decidió abordar el estudio a nivel molecular del mecanismo por el cual dicho tratamiento promueve la expresión del gen Nr4a3. Para ello, implementamos un método de captura de la cromatina "CAPTURE", basada en un sistema CRISPR-dcas9 modificado, que permite dirigir este sistema a una región accesible en el genoma y posteriormente purificar este complejo de cromatina, en donde se localizan factores de transcripción reclutados a este sitio modulando la expresión genética. Utilizando la línea celular C2C12, se generaron células estables que expresan al RNA guía dirigido a una región Proximal de regulación del gen Nr4a3, así como células que expresan al sistema CAPTURE completo. A partir de esto, se purificó la cromatina de esta región y se evaluó su eficiencia visualizando las proteínas recuperadas mediante un gel desnaturizante.

Summary

Due to the importance that skeletal muscle represents for our mobility and postural stability, as well as for the correct functioning of our body, it is important to approach its study in response to treatments that allow these functions to be reestablished. Several naturally occurring molecules capable of improving some pathological phenotypes such as dystrophies, sarcopenia, obesity and diabetes have recently been studied. One of these molecules is Epicatechin, which is a naturally occurring flavonoid found in cocoa and green tea. It has been reported that treatments with this molecule both in healthy and pathological study models, cause a recovery in the expression of important proteins for the generation of energy from oxidative phosphorylation and in the same way an increase in the mitochondrial content in skeletal muscle. So, this response to Epicatechin is comparable with the phenotype shown in acute aerobic exercise, where there is also an increase in the content of mitochondria and their protein complexes; however, it is not known what is the mechanism at the molecular level by which it is possible that Epicatechin modulates the expression of these proteins. In this work, the expression of 2 important genes in the oxidative metabolism of skeletal muscle, Nr4a3 and Perm1, which in turn are modulated by exercise, was evaluated and it was found by quantitative analysis of *in vitro* cultures that their expression also increased in differentiated muscle cells treated with Epicatechin. Therefore, our aim was to study the mechanism by which epicatechin treatment promotes the expression of the Nr4a3 gene. Using the "CAPTURE" chromatin capture method, which is based on a modified CRISPR-dcas9 system, it is possible to direct this system to an accessible region in the genome and subsequently purify associated chromatin complexes responsible of modulating gene expression. Using the C2C12 cell line, stable cells were generated expressing the guide RNA directed to a proximal regulatory region of the Nr4a3 gene, as well as cells that express the CAPTURE system. Then, chromatin of this region was purified, and its efficiency was evaluated by visualizing the recovered proteins through a denaturing gel.

Introducción

1.1 Músculo esquelético

El tejido muscular juega un papel muy importante en los organismos, ya que se encarga de convertir la energía potencial en energía cinética, fungiendo como un elemento transductor. En vertebrados existen tres tipos de músculo: el esquelético, el cardíaco y el liso, de los cuales el esquelético es el único capaz de ser controlado voluntariamente a diferencia del cardíaco y liso donde su control es involuntario.

Los músculos estriados como lo son el esquelético y el cardíaco están conformados por fibras celulares multinucleadas. Cada fibra celular se compone de varias miofibras en paralelo. Dichas miofibras están compuestas por miotubos, que a su vez están formados por miocitos fusionados. (Mukund & Subramaniam, 2020)

1.2 Células satélite

La identificación de estas células data del año 1961, donde en fibras disectadas del músculo tibial de rana se observó un grupo de células mononucleadas en la periferia de las miofibras del músculo esquelético, que por su localización fueron nombradas como células satélite. (Mauro, 1961)

Las células satélite (SCs) son aquellas células progenitoras que darán lugar a las miofibras que componen el músculo esquelético. Estas células residen entre el sarcolema y la membrana basal que rodea cada fibra muscular. En estado de relajación estas células se encuentran quiescentes, y en presencia de estímulos como crecimiento o daño son activadas para iniciar la regeneración de las fibras dañadas, activando su ciclo celular. (Yin, 2013)

Existen factores de crecimiento encargados de regular los procesos de diferenciación y mantener la composición de cada nicho celular. Pax7 es un factor de transcripción crucial expresado en SCs encargado del mantenimiento del “*pool*” de estas células. Una vez que se activan, estas células llevan a cabo divisiones asimétricas, generando una célula destinada al mantenimiento de SCs que expresa solo a Pax7, y la otra para llevar a cabo el proceso de diferenciación celular,

expresando tanto a Pax7 como a Myf5, otro factor regulador miogénico necesario para la miogénesis. (Maltzahn, Jones, Parks, & Rudnicki, 2013)

1.3 Diferenciación de mioblastos

Los mioblastos proliferativos además de expresar a Pax7 y Myf5 también expresan a otro factor denominado MyoD encargado de inhibir al ciclo celular e inducir la diferenciación para dar lugar a los miocitos, expresando genes específicos en dos etapas, denominadas diferenciación temprana y diferenciación tardía. Durante la diferenciación temprana existe una alta expresión de MyoD que contribuye a un aumento en la producción de Miogenina (MyoG), que a su vez inhibirá la expresión de Myf5. Durante la diferenciación tardía tanto MyoD como MyoG contribuirán a la expresión de Mrf4 para posteriormente inducir la expresión de genes de diferenciación terminal y proteínas estructurales características del músculo esquelético maduro. Como se puede observar en la Figura 1, cada etapa de la miogénesis está definida por la expresión de estos factores. (Rugowska, Starosta, & Konieczny, 2021)

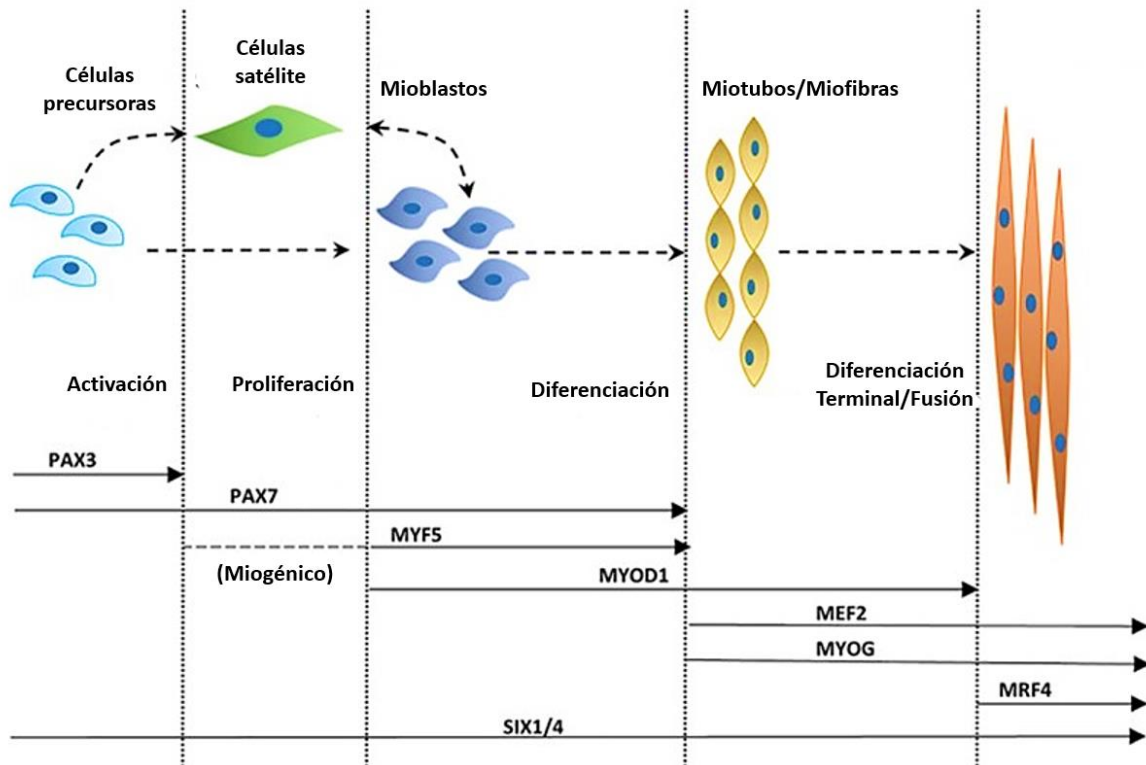


Figura 1. Diferenciación de precursores miogénicos donde se muestran los factores de transcripción específicos de cada etapa, modificado de Mukund & Subramaniam, 2020.

1.4 Clasificación de Miofibras

En el músculo esquelético se pueden encontrar diferentes tipos de fibras que se diferencian de acuerdo a su metabolismo, tamaño y funcionamiento. De forma generalizada se puede clasificar a las miofibras de acuerdo a la velocidad de contracción que presentan, las de tipo I son fibras de contracción lenta y las de tipo II que son fibras de contracción rápida.(Talbot, 2017)

También es posible clasificar a las miofibras según su perfil de expresión proteico, basándose principalmente en el gen que codifica para la cadena pesada de miosina (MYH), donde cada tipo de miofibra expresa una isoforma distinta.

Para las miofibras tipo I sólo existe una variante que expresa principalmente a MYH7 y presenta un metabolismo oxidativo, los músculos enriquecidos con este tipo de miofibras se puede observar un color rojizo debido a su alto contenido de mioglobina, estas miofibras tipo I cuentan con una elevada cantidad de mitocondrias y expresan enzimas oxidativas. Generalmente este tipo de miofibra se encuentran en músculos que se requieren para el mantenimiento de la postura y son altamente resistentes a la fatiga. Debido a que llevan a cabo la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, requieren de un suministro de oxígeno y para satisfacer esta alta demanda, lo almacenan unido a la fracción hemo de la mioglobina. Para las miofibras tipo II existen tres variantes, las de tipo IIA que expresan a la cadena pesada de miosina MYH2 y llevan a cabo un metabolismo oxidativo, las de tipo IIX que expresan a la cadena pesada de miosina MYH1 y las de tipo IIB que expresan a la cadena pesada de miosina MYH4, ambos tipos de miofibras llevan a cabo un metabolismo glucolítico. Estas fibras se pueden encontrar mayormente enriquecidas en músculos utilizados para la movilidad y presentan una alta fatiga. Aquellas fibras con metabolismo glucolítico toman la glucosa proveniente de la sangre o del glucógeno endógeno y los ácidos grasos derivados de los triacilgliceroles del tejido adiposo para cumplir sus requerimientos energéticos.(Schiaffino, 2018)

Cabe recalcar que la proporción de ambos tipos de fibra puede variar dependiendo de cada músculo y su función, de igual forma dicha proporción puede cambiar en función de las actividades de un individuo. Por ejemplo, dos individuos gemelos fueron sujetos al análisis del músculo vasto lateral, donde uno de ellos realizó un entrenamiento, mientras que el otro no. El gemelo entrenado presentó una composición predominante para la cadena pesada de miosina I (MHCI) perteneciente a las fibras de contracción lenta, presentando un 50% más que el gemelo sin entrenamiento. (Plotkin, Roberts, Haun, & Schoenfeld, 2021)

Muchas de las fibras musculares presentan un solo tipo de isoforma de miosina y se conocen como fibras puras, aunque también existen fibras que presentan dos tipos de isoforma de miosina y son denominadas como híbridos. De igual forma el tipo de fibra puede cambiar, siguiendo una continuidad de fibra de contracción lenta a rápida cambiando las isoformas de miosina secuencialmente I↔IC↔IIC↔IIA↔IIAD↔IID↔IIDB↔IIB. (Augusto, Padovani, Eduardo, & Campos, 2004)

1.5 Patologías

Es importante mencionar que existen diversas enfermedades musculares que pueden ser referidas como miopatías o distrofias musculares dependiendo de la causa que las origina. Generalmente las miopatías se caracterizan por estar asociadas a debilidad muscular, a diferencia de las distrofias que pertenecen a un subtipo de miopatías donde existen cambios en la degeneración y regeneración muscular incluso en las biopsias celulares de pacientes con estas patologías. (Dowling, Wehl, & Spencer, 2021)

La distrofia muscular de Duchenne es un desorden caracterizado por mutaciones, ya sean deleciones, duplicaciones o mutaciones puntuales en el gen DMD que codifica para distrofina. Dichas mutaciones llevan a una pérdida de la función de la proteína generando la desintegración de miofibras y regeneración muscular inefectiva debido a las alteraciones generadas en el pool de células satélite, así como su diferenciación. (Tabebordbar, Wang, & Wagers, 2013)

Dentro de los padecimientos que no dependen de mutaciones genéticas como la distrofia, también ocurre la pérdida del músculo asociado a la edad, caracterizado

por una disminución en la musculatura de entre 0.5%-1% por año a partir de los 70 años, este padecimiento se denomina sarcopenia y también se encuentra asociado a la debilidad muscular, pérdida de la movilidad y aumento en grasa corporal. Específicamente se tiene una disminución en el tamaño y número de fibras musculares, así como la pérdida de su función contráctil. (Siparsky, Kirkendall, & Garrett, 2014)

La obesidad, es otra condición, asociada a la inactividad crónica y a la alta ingesta energética, lo cual, puede llevar a la pérdida muscular y el incremento de adiposidad, aumentando el riesgo de desarrollar desordenes metabólicos. El envejecimiento generalmente se encuentra asociado a un enlentecimiento del fenotipo muscular de fibras tipo I, así como una reducción en el número y área de fibras musculares tipo II, lo que lleva a una mayor fragilidad y pérdida de la motricidad. Por otro lado, la obesidad está mayormente asociada con una cantidad predominante de fibras tipo IIx y menor porcentaje de fibras tipo I. (Morgan, Smeuninx, Breen, & Breen, 2020)(Hosoi, Yakabe, Sasakawa, Sasako, & Ueki, 2023)

Otro desorden metabólico, como lo es la diabetes tipo 2, caracterizada por la deficiencia en el funcionamiento de la insulina también afecta al músculo esquelético. La deficiencia tanto en la ingesta de glucosa como en la fosforilación tras la eliminación de nutrientes y la síntesis inefectiva de glucógeno afecta el metabolismo de lípidos, incrementando la ingesta de ácidos grasos y una oxidación mitocondrial deficiente, resultando en un acumulación de triglicéridos en las miofibras. Se ha observado que en pacientes con diabetes tipo 2 existe una reducción en el contenido y función mitocondrial. (Kelley DE, 2002) (Sala & Zorzano, 2016)

1.6 Epicatequina

Debido a que la alimentación juega un papel muy importante en el correcto funcionamiento del organismo, se ha avanzado en establecer la relación entre la medicina y la nutrición, enfocándose principalmente en alimentos de origen natural. Los alimentos funcionales contienen fitonutrientes que pueden beneficiar a la salud,

así como la modulación del sistema inmune en la prevención de enfermedades. (Gupta, 2014)

Recientemente se ha mencionado que el consumo de alimentos que contienen flavonoides lleva a mejoras en el funcionamiento del organismo, como lo es la función arterial, la disminución de la presión arterial, mejoras en la modulación de la homeostasis y sensibilidad a la insulina. Dichos flavonoides se pueden encontrar en una larga variedad de frutas, vegetales y semillas. (Ottaviani, 2011)

La catequina es un flavonoide que gracias a sus 2 centros quirales cuenta con 4 diferentes estereoisómeros: (+)-catequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina y (-)-epicatequina. Estos flavonoides se encuentran principalmente en el cacao y en el té. Se ha reportado que los extractos de té verde disminuyen la pérdida muscular y preservan su función durante su desuso, aunque no ha sido observado que promueva la regeneración muscular. (Alway et al., 2015) (Kim et al., 2017)

1.7 Epicatequina, ejercicio y metabolismo oxidativo.

Nogueira et al estudiaron en modelos murinos sanos el papel de la epicatequina administrada durante 15 días consecutivos a una concentración de 1mg/kg cada 12 horas. Para ello, se tomaron los músculos cuádriceps, EDL y plantaris para analizar su capilaridad muscular, niveles de proteínas presentes en la fosforilación oxidativa y el incremento en volumen mitocondrial, mostrando mejoras incluso al ser comparados con los controles que corrieron durante 30 minutos, 5 veces por semana. Es destacable que se encontró un incremento en la expresión del factor de transcripción mitocondrial Tfam, el cual además de cumplir la función de proteger el DNA mitocondrial (mtDNA) del daño por las especies reactivas de oxígeno (ROS), inicia la transcripción de genes mitocondriales. Estos resultados sugieren que la epicatequina podría emular los procesos que suceden a nivel molecular cuando se realiza actividad física de este tipo. (Nogueira et al., 2011) (Theilen, Kunkel, & Tyagi, 2018)

En pacientes con diabetes tipo 2 y falla cardíaca que presentan altos niveles de estrés oxidativo, se ha demostrado que la suplementación de 100mg de cocoa rica en epicatequina durante 3 meses provoca una mejoría, recuperando los elementos

clave en el balance redox, así como antioxidantes fisiológicos y enzimas que participan en el metabolismo mitocondrial. (Ramírez-Sánchez, 2013)

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de la administración de epicatequina en músculo esquelético en modelos de ratones knockout δ -sarcoglicano. Estos ratones fueron utilizados debido a que representan un modelo de estudio patológico de distrofia, donde la administración de epicatequina durante 2 semanas de tratamiento provoca la normalización de la carbonilación de proteína total, un incremento en la relación de glutatión reducido/oxidado y una mejoría en la actividad de las enzimas SOD2, catalasa y citrato sintasa que participan en el metabolismo oxidativo. (Ramirez-sanchez et al., 2014)

En el estudio de Mcdonald et al. se planteó la hipótesis de que la epicatequina administrada por 8 semanas puede incrementar biomarcadores de biogénesis mitocondrial en tejidos musculares de pacientes con Distrofia muscular de Becker, encontrando principalmente que la proteína PGC1 α se encuentra sobre-expresada en aquellos pacientes que fueron tratados, con respecto al control. Así mismo también se observó un aumento en biomarcadores de regeneración muscular como MyoG, MyoD, MEF2A y Myf5 (Mcdonald et al., 2021)

El coactivador 1 α del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (PGC1 α) es un regulador clave del metabolismo energético, teniendo importancia en los procesos de biogénesis mitocondrial, así como en la oxidación de ácidos grasos. Es expresado en tejido adiposo y músculo esquelético, preferencialmente se expresa en músculos enriquecidos con fibras tipo I (Lin, Wu, Tarr, Zhang, & Wu, 2002)

Es un coactivador transcripcional capaz de aumentar el contenido mitocondrial y mejorar la capacidad oxidativa del músculo esquelético. La delección de este gen en ratones coincide con una disminución en el contenido mitocondrial, así como una reducción en la capacidad oxidativa. Adicionalmente cuando estos ratones PGC1 α Knock-out se someten a ejercicio se observa un aumento en la inflamación y daño de las fibras musculares, sugiriendo que este coactivador también juega un papel importante en la integridad del músculo esquelético.(Handschin et al., 2007)

Por otro lado se ha observado que la sobreexpresión de PGC1 α en modelos patológicos murinos de distrofia muscular de Duchenne (mdx) lleva a un aumento en la expresión de la cadena pesada de miosina I (MHC) representativa del tipo de fibra I con un metabolismo oxidativo. Indicando que este coactivador es capaz de modular la identidad del tipo de fibra a estos niveles elevados de expresión. (Selsby, Morine, Pendrak, Barton, & Sweeney, 2012)

Dentro de los genes que responden de manera positiva ante diferentes tipos de ejercicio, podemos encontrar a PGC1 α como uno de los biomarcadores mayormente identificados, sin embargo, no es el único de ellos.

De acuerdo con los datos transcriptómicos de músculo esquelético de múltiples estudios en respuesta a la inactividad, ejercicio agudo y ejercicios de entrenamiento, Pilon et al. llevaron a cabo un meta-análisis para identificar genes que responden ante el ejercicio y la inactividad. Se encontraron diversos biomarcadores dentro de los cuales el gen que tuvo una mayor significancia estadística es Nr4a3, el cual aumenta su expresión en ejercicio aeróbico agudo y entrenamiento, mientras que en inactividad disminuye su expresión. (Pilon et al., 2020)

Nr4a3 es un receptor nuclear el cual es principalmente inducido por la vía de señalización β 2-adrenergica en músculo esquelético y se encuentra asociado a la homeostasis de lípidos, carbohidratos y energía. Forma parte del subgrupo NR4A de receptores nucleares huérfanos de unión al ADN. (Pearen et al., 2008)

En experimentos *in vitro* se ha observado que el silenciamiento de Nr4a3 resulta en una disminución de la oxidación de palmitato y una acumulación de lactato, indicando que este receptor tiene su actividad en el metabolismo aerobio de carbohidratos y el metabolismo de ácidos grasos. En otro experimento *in vivo* se utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresan a este receptor, los cuales fueron alimentados con una dieta normal y alta en grasas, observando que se mantuvieron niveles normales de glucosa en ayunas en ambas dietas, lo cual está asociado a un aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 a nivel proteína y un aumento en la expresión a nivel transcrito del gen Hk2 el cual juega un papel

importante en el metabolismo o almacenamiento de la glucosa en músculo esquelético. (Pearen et al., 2013)

En el experimento de sobreexpresión de Nr4a3 de Pearen et al., se analizó el perfil transcripcional del músculo cuadriceps para identificar cuales son los genes que se encuentran sobreexpresados o atenuados en los ratones transgenicos. Dentro de los 50 genes identificados que son regulados a la alza, se tiene al gen Perm1 tambien identificado como 2310042D19Rik con una razón de cambio de 4.6, el cual dentro de los análisis metagenómicos de Pillon et al., se identificó como uno de los genes que responden de manera positiva ante el ejercicio y de manera negativa en inactividad, presentando un valor de correlación con Nr4a3 de 0.717 como se observa en la Figura 2. Lo que indica que este gen Perm1, al igual que el receptor nuclear puede ser considerado como un biomarcador de ejercicio.

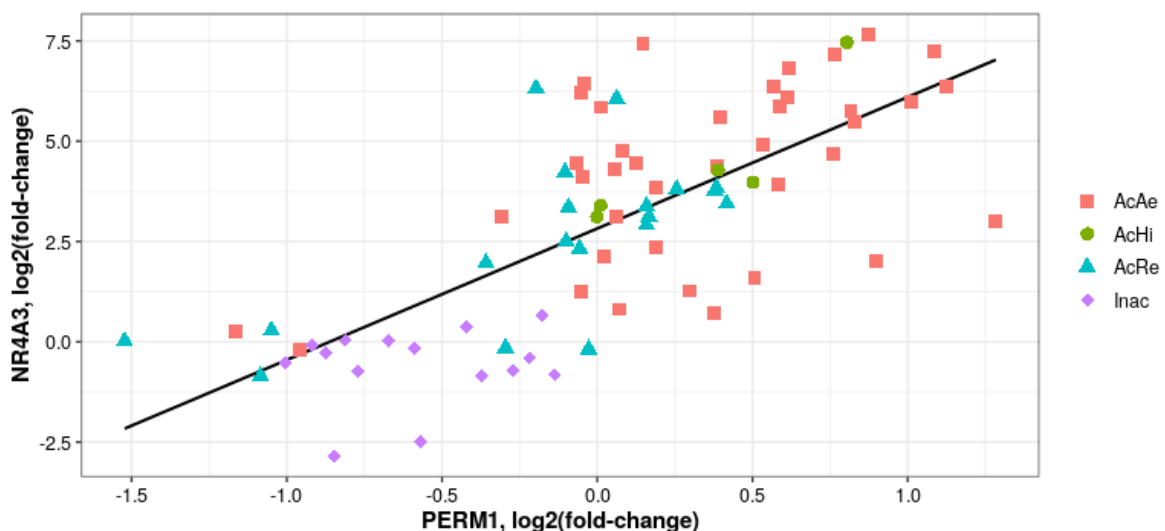


Figura 2. Gráfico de correlación tomado de la herramienta de meta-análisis (<https://metamex.serve.scilifelab.se/>) de Pillon et al. Comparando la expresión de NR4A3 vs PERM1 en ejercicio e inactividad. AcAe: Ejercicio aeróbico agudo, AcHI: Ejercicio agudo de alta intensidad, AcRe: Ejercicio agudo de resistencia, Inac: Inactividad.

La proteína Perm1 se localiza en la membrana mitocondrial, donde interactúa con el complejo MICOS-MIB, encargado de organizar las crestas mitocondriales y estabilizar la unión entre la membrana interna y externa de las mitocondrias.

También se ha reportado que Perm1 conecta las mitocondrias con el sarcolema por medio de su interacción con la proteína ankirina B (ANKB). (Bock et al., 2021)

Perm1 se expresa selectivamente en músculo esquelético y cardiaco. Se ha descrito a nivel *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* en modelos murinos donde Perm1 es sobre expresado, el aumento del contenido mitocondrial, así como el incremento de proteínas importantes en el metabolismo oxidativo. Los resultados de Cho et al., muestran que Perm1 regula algunas vías del músculo como la contracción muscular, vascularización y actividad metabólica. Perm1 aumenta los niveles de mRNA de PGC1 α y ERR α , al igual que aumenta la expresión de factores de transcripción importante como Tfam y Tfb2m, involucrados en la replicación y transcripción de ADN mitocondrial. (Cho et al., 2019)

Cho et al., en un experimento con ratones, silenciaron la expresión de Perm1 utilizando virus adenoasociados (AAV) en el músculo gastrocnemio. Posteriormente se sometieron a una ronda de ejercicio agudo aerobio y se analizó la expresión de genes clave que responden al ejercicio, mostrando que para los genes PGC1 α y Nr4a3 existe una reducción significativa en su expresión con respecto al control. De igual forma se demostró que Perm1 es necesario para llevar a cabo la activación de CaMKII y la vía de señalización p38 MAPK, demostrando así su importancia en la adaptación del músculo esquelético al ejercicio.

Durante el ejercicio se liberan algunas moléculas, las cuales pueden fungir como señalizadores para activar la respuesta de procesos metabólicos. CaMKII es una quinasa dependiente de calcio, la cual se activa en respuesta a los niveles de calcio intracelular, cuando las contracciones musculares generadas por el ejercicio provocan un aumento de la concentración de calcio, se activa esta ruta de transducción de señales, promoviendo la activación de la biogénesis mitocondrial y un aumento en la expresión de PGC1 α . (Joseph, Anand, Malindisa, Oladipo, & Fagbohun, 2021)

p38 MAPK es una quinasa que se activa en respuesta a estímulos celulares, como el estrés mecánico generado por el ejercicio. Su activación es necesaria para llevar

a cabo la diferenciación de células miogénicas y regular el metabolismo glucolítico para cumplir con los requerimientos energéticos. (Akimoto et al., 2005)

Se ha reportado que otras moléculas son capaces de inducir cambios en la expresión de genes mimetizando *in vitro* parte de lo que sucede en el ejercicio. Forskolina es un diterpeno bicíclico que se puede encontrar de forma natural en la planta coleus (*Plectranthus barbatus*). El tratamiento de miotubos de donadores jóvenes y envejecidos con 100 μ M de Forskolina, provoca un aumento a nivel transcrito de Apelina, un péptido inducido por el ejercicio, el cual se ha observado que en envejecimiento mejora el metabolismo muscular y en obesidad reduce la resistencia a insulina. De manera específica, Forskolina funge como un activador de la enzima adenilato ciclasa, generando un aumento en los niveles de AMPc, el cual activará a la proteína cinasa A (PKA) desencadenando una vía de transducción de señales. (Vinel et al., 2018)

1.8 Sistema CAPTURE

Debido al poco conocimiento que se tiene acerca de los complejos que regulan a genes diferencialmente expresados en células musculares tratadas con epicatequina, el sistema CAPTURE resulta ser un sistema prometedor con diversas ventajas que permiten la purificación de dichos complejos para ser analizados posteriormente. El nombre de este sistema proviene de sus siglas Purificación por afinidad CRISPR in situ de elementos regulatorios, el cual es un sistema basado en una variante del sistema CRISPR-Cas9 que cuenta con un dCas9 modificada que carece de su actividad nucleasa y permite utilizar RNAs guía (sgRNA) para dirigir este sistema a regiones específicas del genoma, omitiendo el corte que realizaría normalmente la Cas9. El objetivo de este sistema consiste en identificar complejos proteicos reguladores de la cromatina en loci específicos. Dichas proteínas pueden ser analizadas por geles desnaturizantes y western blots o también pueden ser identificadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS-MS). (Liu et al., 2017)

Este sistema se compone de tres elementos clave que son: la dCas9 fusionada a un péptido N-terminal aceptor de biotina (FB-dCas9), una holoenzima sintetasa de

biotina proveniente de *E. coli* (BirA) y el sgRNA optimizado. Donde la FB-dCas9 al ser expresada establemente será biotinilada por BirA en su péptido aceptor y será guiada por el sgRNA hacia el locus de interés. Las ventajas de utilizar este sistema radican en la alta afinidad que presenta la estreptavidina por la biotina, que al ser superior al uso de anticuerpos ofrece una purificación más eficiente y estable, permitiendo la captura de complejos DNA-proteína, así como una mayor pureza reduciendo la contaminación por otras proteínas. Otra ventaja de este sistema radica en el hecho de que muy pocas proteínas naturalmente biotiniladas se localizan en el núcleo, aumentando aún más la especificidad durante la purificación. (Liu et al., 2018)

Posteriormente en 2020 Liu et al., desarrollaron un método CAPTURE 2.0, el cual es más eficiente que la estrategia anterior, logrando recuperar 13.6 veces más DNA de la región específica que el CAPTURE 1.0. Las modificaciones del nuevo sistema radican en que la expresión y biotinilación de la proteína dCas9 dependerá de un solo vector, el cual es de expresión lentiviral al igual que el vector de expresión de los sgRNAs. La biotinilación de la proteína dCas9 se llevará a cabo de manera endógena por ligasas de proteína-biotina eucariotas las cuales se encargan de biotinar naturalmente a distintas enzimas carboxilasas; la secuencia de esta dCas9 cuenta con un marcaje BioTAP-tag de 69 aminoácidos en el extremo carboxilo, el cual le permite que sea reconocida por estas ligasas de biotina y posteriormente se inmunoprecipitadas por afinidad con las perlas de estreptavidina. En la Figura 3 se puede observar un diagrama de flujo experimental del método CAPTURE 2.0. (Liu et al., 2020)

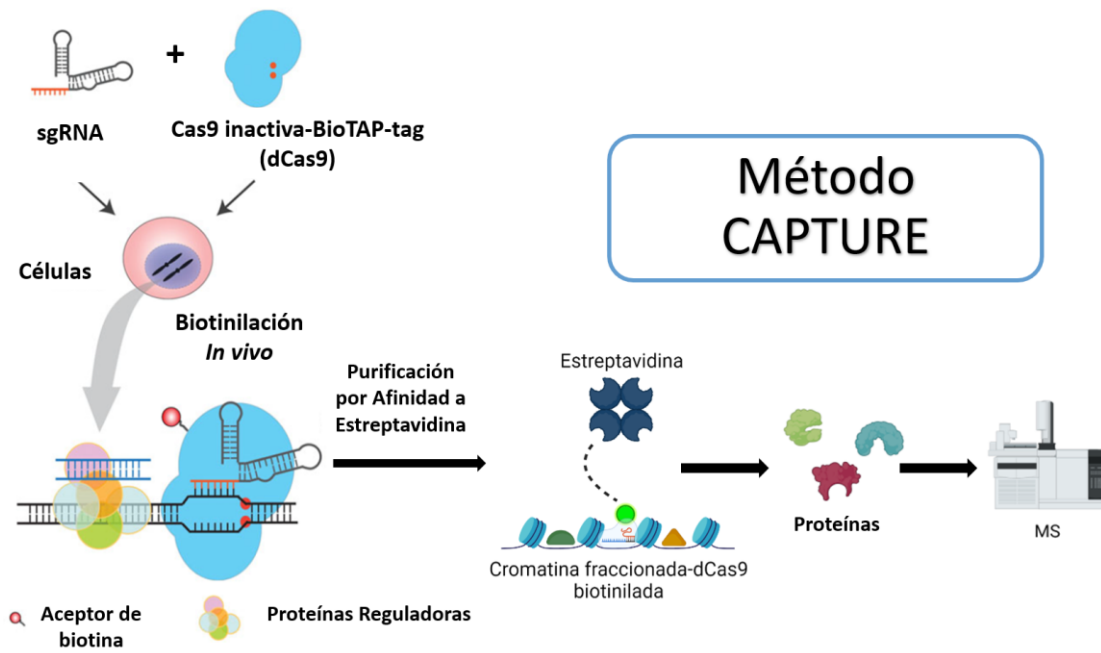


Figura 3. Diagrama del método de captura de la cromatina CAPTURE 2.0

Justificación

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado previamente la expresión de genes específicos de miosinas en cultivos de células C2C12 tratadas con epicatequina, donde se identificó un incremento en la expresión de MYH7 y MYH4, además de un aumento en la proliferación celular. Por lo que se piensa que la epicatequina juega un papel en la modulación de la expresión de miosinas y por ende también en la diferenciación celular.

Varios estudios acerca del efecto del tratamiento con epicatequina en músculo esquelético han mostrado un restablecimiento en su funcionamiento, así como un aumento en los niveles de proteínas mitocondriales tanto en modelos patológicos como en modelos sanos.

Sin embargo, aún se desconoce a nivel molecular el mecanismo por el cual la epicatequina interviene en la expresión de estos genes involucrados en el metabolismo oxidativo, principalmente aquellas proteínas que funcionan como factores de transcripción que se encuentran asociados a elementos reguladores en cis (CREs) en los complejos de cromatina y promueven su expresión, por lo que resulta interesante utilizar el sistema CAPTURE para identificar estos factores asociados, lo cual nos permitirá relacionarlos con las vías de señalización que desencadenan esta respuesta generada por el tratamiento con epicatequina.

Objetivo general

Obtener proteínas asociadas a cromatina diferencialmente enriquecidas en regiones de regulación transcripcional en genes implicados en el metabolismo oxidativo del músculo esquelético de ratón, en respuesta a epicatequina por medio de un método basado en el sistema CRISPR-dCas9.

Objetivos específicos

- Diseñar sgRNAs dirigidos hacia regiones reguladoras de los genes blanco (Nr4a3, Perm1)
- Clonar los sgRNA en un vector de sobre-expresión.
- Transducir a las células C2C12 con el vector de dCas9 y sgRNA para tratarlas durante diferenciación con epicatequina.
- Confirmar la eficiencia del sistema CAPTURE mediante geles desnaturalizantes.

Hipótesis

Existen complejos de cromatina diferencialmente asociados a elementos de regulación de genes musculares involucrados en el metabolismo oxidativo en células C2C12 tratadas con epicatequina.

Metodología

6.1 Evaluación de la expresión de genes candidato

Previo al diseño de los sgRNAs se decidió evaluar la expresión de 4 genes propuestos, los cuales están involucrados en el metabolismo oxidativo y responden ante la actividad física. Dichos genes son Pgc1a, Pdk4, Perm1 y Nr4a3.

Para evaluar su expresión se cultivaron 110,000 células C2C12 por pozo en una placa de 6 pozos, se proliferaron durante 48 horas para llegar a una alta confluencia utilizando 15% de suero fetal bovino (SFB) y se indujo a la diferenciación cambiando el SFB por 1% de suero equino (SE), y adicionalmente fueron tratadas diariamente con una concentración de 20uM de Epicatequina o con el vehículo DMSO como control. Dicho tratamiento se llevó a cabo de manera diaria cambiando el medio hasta cumplir 120 horas de diferenciación. Posteriormente se recuperaron las células para llevar a cabo la extracción de RNA utilizando el kit comercial EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez extraído y cuantificado el RNA, por medio de RT-PCR se obtuvo su cDNA, el cual fue analizado por PCR punto final y posteriormente qPCR para evaluar el nivel de expresión de cada uno de los genes propuestos.

Reacción de RT-PCR

En dos tubos por separado, se prepararon las mezclas A y B, de acuerdo con las siguientes tablas:

Mezcla A

Reactivo	Cantidad
Oligo dT (500ug/ml)	1uL
RNA total	1ug
Mezcla de dNTP (2.5mM de cada dNTP)	1uL
Agua libre de nucleasas	Aforar a 12uL

Mezcla B

Reactivo	Cantidad
Buffer First-Strand 5x	4uL
DTT 0.1M	2uL
Agua libre de nucleasas	1uL

El contenido de la mezcla A se calentó a 65°C por 5 min, inmediatamente se colocó en hielo y se añadió el contenido de la mezcla B, se mezcló bien por pipeteo y se incubó por 2 min en hielo. Posteriormente se añadió 1µl de la enzima M-MLV RT de Invitrogen, se mezcló bien por pipeteo y se incubó por 50 min a 37°C. Una vez cumplido ese tiempo se inactivó la reacción elevando la temperatura a 70°C por 15 min.

Reacción de PCR punto final

A partir del cDNA obtenido de la RT-PCR se prepara una dilución 1:4 con agua libre de nucleasas a una concentración final de 10ng/uL y se utiliza para la siguiente mezcla.

Reactivo	Cantidad
Master Mix (2X)	10uL
Primer Forward (10mM)	0.75uL
Primer Reverse (10mM)	0.75uL
cDNA	2uL
Agua libre de nucleasas	Aforar a 20uL

*Se debe preparar una reacción por cada muestra y su control Negativo sin templado.

Y se corre en el termociclador utilizando el siguiente programa:

Fase		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial		94	3 min
Ciclos de PCR 35	Desnaturalización	94	45 seg
	Alineamiento	62	30 seg
	Extensión	72	90 seg
Extensión Final		72	7 min
Enfriamiento		4	Indefinidamente

Reacción de qPCR

Se preparó la siguiente mezcla:

Reactivo	Cantidad
SYBR Green Master Mix de Applied Biosystems	10uL
Primer Forward (10uM)	0.5uL
Primer Reverse (10uM)	0.5uL
Agua libre de nucleasas	7uL
cDNA	2uL

*Se debe preparar una reacción por cada muestra junto con su duplicado técnico y su control Negativo sin templado.

Una vez preparadas las reacciones se procede a colocarlas en el equipo, en este caso se utilizó un Rotor-Gene Q y se corre el programa siguiente:

Fase	Hold	PCR	
		Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
Temperatura	95.0°C	95.0°C	60.0°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto

Tratamiento con Forskolina

Para evaluar la expresión de los genes candidato con Forskolina se cultivaron 110,000 células C2C12 por pozo en una placa de 6 pozos, se proliferaron durante 48 horas para llegar a una alta confluencia utilizando 10% de suero fetal bovino (SFB) y se indujo a la diferenciación cambiando el SFB por 1% de suero equino

(SE), y adicionalmente fueron tratadas a partir de la 72hrs de diferenciación con una concentración de 100uM de Forskolina o con el vehículo DMSO como control, dicho tratamiento se realizó una sola vez y se dejó hasta cumplir las 120 horas de diferenciación. Posteriormente se recuperaron las células para llevar a cabo la extracción de RNA utilizando el kit comercial EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez extraído y cuantificado el RNA, por medio de RT-PCR se obtuvo su cDNA, el cual fue analizado por PCR punto final y posteriormente qPCR de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

6.2 Diseño de los sgRNAs dirigidos hacia regiones de los genes blanco

Una vez obtenidos los niveles de expresión se procedió a diseñar los sgRNAs dirigidos a 3 regiones reguladoras río arriba de los genes blanco. De acuerdo a la predicción de ENCODE de CREs (Cis Regulatory Elements) se eligió una región cercana al sitio de inicio de la Transcripción (TSS), una región Proximal (PRR) y una región distal (DRR) en el genoma de ratón GRCm38/mm10 donde existen posibles Elementos Regulatorios. Las regiones determinadas se analizaron junto con los datos reportados de sensibilidad a DNasal (Stamatoyannopoulos, 2011) en muestras de músculo esquelético de ratones de 8 semanas para asegurar que los sitios elegidos se encuentren accesibles. Aunado a esto, se predijeron los posibles motivos de unión de factores de transcripción específicos de músculo utilizando la herramienta bioinformática MATCH 1.0 (Matrix Search for Transcription Factor Binding Sites) con la finalidad de evitar que las secuencias de los sgRNA se encuentren traslapadas con algún motivo de unión. Utilizando la herramienta CRISPR Finder (<https://wge.stemcell.sanger.ac.uk/>) se buscaron posibles sgRNAs en estas regiones que cumplieran con las características anteriores.

La secuencia obtenida de la herramienta CRISPR Finder corresponde a 20 nucleótidos que cuentan con un sitio PAM adyacente que permite el reconocimiento por la dCas9. Esta herramienta también analiza el potencial fuera de objetivo de las secuencias CRISPR propuestas y lo compara con las posibles coincidencias en el

genoma, con hasta 4 pb de desajuste, minimizando los posibles efectos fuera de blanco que pudiera tener el sistema CAPTURE.

De acuerdo a la metodología CAPTURE se reemplaza la secuencia específica de un Primer Forward:

5'ggagaaCCACCTTGTGGAACTAGTTAGGCGTGTAGTTTAAGAGCTATGC
TGGAACAGCA3'

La secuencia subrayada es la secuencia específica del guía, mientras que las letras en minúscula señalan el sitio de corte que será utilizado para clonar y el resto forma parte de la estructura del sgRNA.

6.3 Clonación de los sgRNA en un vector de sobre-expresión

Previamente a la clonación de los sgRNAs se debe confirmar la identidad de los plásmidos que se serán utilizados para expresar el sistema de captura.

Vector	Enzimas de Restricción	Fragmentos esperados
psPAX2	EcoRI	6,323pb 4,730pb
pCMV-VSV-G	EcoRI	5,689pb 1,574pb
pslq1651-sgRNA(F+E)-sgGAL4	BstXI, XhoI	8,190pb 118pb
CAPTURE2_pLVX-EF1a-dCas9-CBio-IRES-zsGreen1	BstXI	10,210pb 1,800pb 1,200pb

Para cada reacción de digestión enzimática se utilizó la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen
Buffer de enzima (10X)	2uL
Vector	Correspondiente a 1ug de plásmido
Enzima de restricción	Correspondiente a 10U de enzima
Agua	Aforar a 20uL
Volumen Final	20uL

Cada reacción se incubó a 37°C durante al menos 3 horas para asegurar la digestión completa de cada vector. Posteriormente se analizó el producto de digestión en un gel de Agarosa al 1.2% utilizando como control el vector sin digerir.

Para la clonación de los sgRNA, se llevó a cabo una reacción de PCR de cada uno de los guías y posteriormente el amplicon obtenido se digirió enzimáticamente con las enzimas de restricción BstXI y XhoI. El plásmido SLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 también fue digerido y purificado para su clonaje utilizando las mismas enzimas de restricción. El esqueleto del plásmido SLQ1651-sgRNA(F+E) fue ligado con el sgRNA amplificado para generar el vector de sobre-expresión.

La reacción de PCR para amplificar el fragmento a clonar en el vector, se preparó de la siguiente manera:

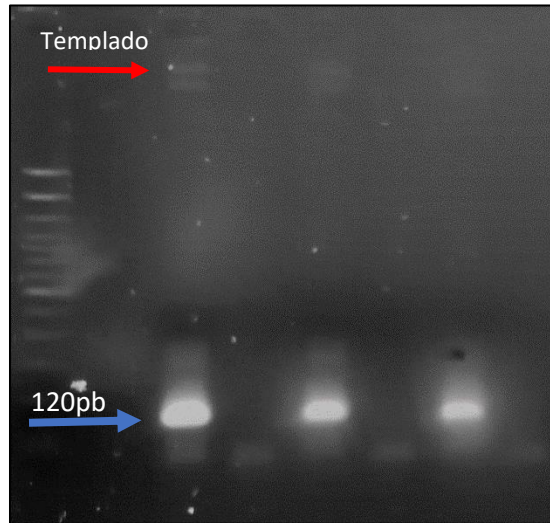
Reactivo	Volumen
Master Mix	10uL
Primer Forward Específico	1uL
Primer Reverso Universal	1uL
Templado pslq1651-sgRNA(F+E) sgGAL4 (30ng/ul)	2uL
Agua	6uL
Volumen Final	20uL

El programa utilizado en el termociclador es el siguiente:

Fase		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial		98	2 min
Ciclos de PCR 35	Desnaturalización	98	15 seg
	Alineamiento	65	25 seg
	Extensión	72	30 seg
Extensión Final		72	2 min
Enfriamiento		4	Indefinidamente

Se corre el producto de PCR en un gel de Agarosa al 1.2% / 40 minutos / 100V.

En este gel nuestro amplicon corresponde a una banda en el tamaño de 120pb.



Utilizando el “StrataPrep DNA Gel Extraction Kit” se purificó el fragmento de gel correspondiente a la banda de 120pb.

**Se utilizan 300ul de Buffer de extracción por cada fragmento.

**Se eluye en 50ul de Agua Ultrapura.

Posteriormente se cuantificó el DNA recuperado, el cual fué utilizado en una segunda reacción de PCR. Es necesario llevar a cabo una segunda reacción de PCR por las siguientes razones:

- El rendimiento obtenido de la purificación del gel es muy bajo, no podrá ser usado para la ligación, pero si como templado para una segunda PCR
- La segunda PCR será purificada con el Kit de purificación de PCR, con el cual se obtienen buenos rendimientos de DNA
- No se puede utilizar el kit de purificación de PCR para purificar el amplicon de la primera reacción ya que en la primer PCR se tiene el vector usado como templado, el cual no se quiere purificar. Por eso la primera purificación se hace por Gel y la segunda por columna.

Se prepara una segunda reacción de PCR por duplicado.

Reactivo	Volumen
Master Mix	20uL
Primer Forward Específico	2uL
Primer Reverso Universal	1.8uL
Templado Purificado PCR1	(Lo proporcional a 20ng)
Agua	26.2uL
Volumen Final	50uL

**Se utiliza el mismo programa del termociclador de la PCR1

Se corren 5ul de cada reacción en un gel de agarosa 1.2% / 40min/100V para confirmar que la reacción se llevó a cabo correctamente.

Una vez observada la banda a 120pb en el gel se debe purificar el producto de PCR2 utilizando el "EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit"

**Se procesan las dos reacciones en una misma columna de purificación.

Posteriormente se preparan las reacciones de digestión enzimática para generar los extremos cohesivos en el vector y en el inserto.

Digestión del vector pslq1651-sgRNA(F+E) sgGAL4

Se llevan a cabo 3 reacciones para obtener un buen rendimiento de purificación (3ug).

Reactivo	Volumen
NEBuffer 3.1 (NEB)	2uL
Enzima BstXI (10U)	1 uL
Enzima XhoI (10U)	0.5uL
Plásmido pslq1651-sgRNA(F+E) sgGAL4 (1ug)	-
Agua Utrapura	Aforar a 20ul

**La reacción se incuba a 37°C durante toda la noche para asegurar la digestión completa.

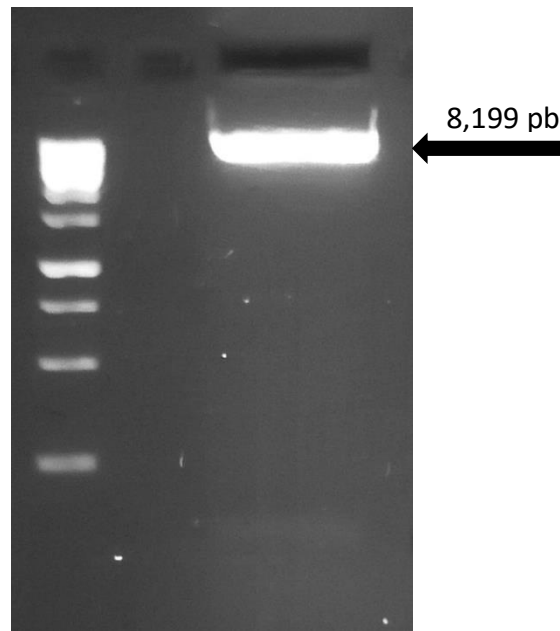
Digestión del Inserto (Producto de PCR2)

Reactivo	Volumen
NEBuffer 3.1 (NEB)	2uL
Enzima BstXI (10U)	1 uL
Enzima XhoI (10U)	0.5uL
Producto de PCR2 (500ng)	-
Agua Utrapura	Aforar a 20ul

Volumen Final	20uL
---------------	------

**La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche para asegurar la digestión completa.

Para purificar el Vector Digerido se corre en un gel de Agarosa al 1.2%/30 minutos/80V.



Se corta la banda superior correspondiente al Vector vacío (8,199pb) y se procesa de acuerdo al “StrataPrep DNA Gel Extraction Kit”.

Para purificar el Inserto (Producto de PCR2) digerido se debe confirmar el corte por las enzimas, corriendo un gel de Acrilamida al 15%/60 minutos/80V. Una vez confirmado el corte se procede a purificar el Inserto utilizando el kit “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit”.

Ligación vector-inserto

Se prepara una reacción de ligación por cada sgRNA:

**Se utilizó la enzima Ligasa T4 (ThermoFisher)

Reactivo	Volumen
Buffer T4 Ligase	3uL
Ligase T4 (5 Weiss U/ul)	0.6uL
Vector Vacío (pslq1651-sgRNA(F+E) sgGAL4)	200ng
Inserto (Producto de PCR2)	100ng
Agua Utrapura	Aforar a 30ul
Volumen Final	30uL

**La reacción se incuba a temperatura ambiente (Aprox 25°C) durante 4 horas.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se procede a transformar *E.coli* TOP10 Competentes. Para transformar 100uL de Bacterias se utilizaron 10uL del producto de ligación.

Las bacterias *E.coli* fueron incubadas con el producto de ligación en hielo durante 30 minutos, posteriormente se realiza un choque térmico de 45-60 segundos a 42°C y se vuelven a incubar en hielo durante 2 minutos.

Se añade 1ml de medio LB sin antibiótico y se incuba a 37°C/250rpm/2.5 horas.

Después se centrifuga a 4000rpm durante 5 minutos y se decanta el sobrenadante. Se re-suspende la pastilla celular en 100uL de medio LB y se plaquea en una placa de LB/AMP. Se incuba durante 16 horas a 37°C.

Validación de los vectores clonados

Se eligen al menos 10 de las colonias obtenidas, se aíslan y se prueban para validar su identidad. En primera instancia se confirmaron por medio de PCR de colonia. Utilizando un par de primers específicos, donde el Forward alinea directamente con la región específica de cada sgRNA y el primer Reverse es universal para este vector y alinea con el sitio de corte XhoI. El tamaño del amplicon esperado es de 140pb.

ID	SECUENCIA PRIMER FORWARD 5'-3'
NR4A3 DRR-sgRNA	GGGCATGTTTATAGTTCAGTACG

NR4A3 PRR-sgRNA	TTGGAGTCGGGGCGCCCCTTA
NR4A3 TSS-sgRNA	TTGTTGGGCGCCGCCGAGAGGTT

ID	SECUENCIA REVERSE 5'-3'
REV-UNIV	GCCTAATGGATCCTAGTACTCG

Posteriormente las colonias positivas deberán ser validadas con Secuenciación por el método de Sanger.

6.4 Transducción de células C2C12 con el vector de dCas9 y sgRNA para tratarlas durante diferenciación con epicatequina

Debido a que el plásmido pslq1651-sgRNA(F+E) sgRNA utilizado para expresar los sgRNA cuenta con un cassette de resistencia a Puromicina y el plásmido plvx-EF1a-dCas9-CBio-IRES-zsGreen utilizado para expresar la dCas9 no cuentan con cassette de resistencia a antibiótico se decidió generar de inicio una línea celular estable C2C12 que exprese a los sgRNA.

Producción Lentiviral

Se sembraron 2×10^6 células Lenti-X 293T en una placa de 60mm con medio de proliferación y se incubaron toda la noche. Previamente estas placas fueron tratadas con colágeno para asegurar la adhesión de las células durante toda la producción lentiviral ya que tienden a despegarse de la placa a una alta confluencia. A partir de una solución stock de colágeno al 0.01% en ácido acético 0.2%, se prepara una solución de trabajo en una relación 1:4 (colágeno stock : etanol 60%) Las placas son tratadas con esta solución de trabajo durante al menos 1 hora, se retira la solución y se dejan secar con luz UV para asegurar su esterilidad. No se debe exponer por tiempos prolongados a la luz UV ya que el colágeno puede cristalizarse y dañar a las células.

A las células cultivadas toda la noche se les realiza un lavado con PBS y se añaden 2mL de Medio Opti-MEM, incubándose a 37°C/5% CO2 durante el tiempo de preparación de la mezcla de transfección.

Para cada placa de 60mm se utilizan las siguientes cantidades de plásmido:

Vector	Cantidad
psPAX2	4ug
pCMV-VSV-G	1.2ug
pslq1651-sgRNA(F+E)-sgRNA	7.8ug

En un tubo se genera la mezcla A en la cual se diluyen 24uL de Lipofectamina 3000 en 125uL de Opti-MEM y se vortexea durante 2-3 segundos. En otro tubo se prepara la mezcla B, se toma el volumen proporcional a la cantidad de cada plásmido y se diluye en 125uL de Opti-MEM, se añaden 20uL del reactivo p300 y se mezcla bien por pipeteo. Posteriormente se añade la mezcla B a la mezcla A y se mezcla por pipeteo. Se incuba a temperatura ambiente de 15-25 minutos para que se formen los complejos y una vez pasado este tiempo se añade directamente por goteo a las células Lenti-X 293T con Opti-MEM. Se dejan incubar durante 5-6 horas, se retira el medio con los complejos de transfección y se cambia por medio de proliferación. A partir de este momento se inicia la producción de los lentivirus y se cuentan de 48-72 horas para recuperar el sobrenadante donde se encontrarán los lentivirus que serán utilizados para la transducción.

Se deben sembrar 70,000 células C2C12 por pozo con medio de proliferación en una placa de 6 pozos, 48 horas previas a la recuperación de los lentivirus. Y una vez recuperado el sobrenadante lentiviral se centrifuga a 1000rpm/4°C/5 minutos para sedimentar cualquier remanente de células Lenti-X. Se recupera el sobrenadante en otro tubo y se le añade SFB a un 10% y polybrene a una concentración final de 10ug/mL. Se reemplaza el medio de las células C2C12 por 1.5mL de esta mezcla Lentiviral por pozo, se incuba a 37°C/5% CO2 de 24-36 horas y se cambia por medio de proliferación.

Después de 48hrs en medio de proliferación se cambia por medio de selección el cual incluye 1.2µg/mL de Puromicina. Una vez que llegaron a una alta confluencia se debe realizar el pase de estas células para evitar que comiencen su diferenciación. Cuando las células fueron seleccionadas durante 6 días con Puromicina una fracción fue almacenada con SFB/DMSO (90%/10%) a -80°C en alícuotas y la otra fracción fue utilizado para los experimentos siguientes.

Para generar los lentivirus con el vector dCas9-CBio-IRES-zsGreen utilizado para expresar la dCas9 se siguió la misma estrategia que para los sgRNAs. Sin embargo se realizó una producción de mayor volumen utilizando placas de 100mm, donde se sembró la noche anterior a la transfección 4×10^6 células Lenti-X por placa. Se ajustó la cantidad de plásmido a:

Vector	Cantidad
psPAX2	8.4ug
pCMV-VSV-G	3.4ug
dCas9-CBio-IRES-zsGreen	13ug

A las células cultivadas toda la noche se les realiza un lavado con PBS y se añaden 2mL de Medio Opti-ME, incubándose a 37°C/5% CO₂ durante el tiempo de preparación de la mezcla de transfección.

En un tubo se genera la mezcla A en la cual se diluyen 42uL de Lipofectamina 3000 en 250uL de Opti-MEM y se vortexea durante 2-3 segundos. En otro tubo se prepara la mezcla B, se toma el volumen proporcional a la cantidad de cada plásmido y se diluye en 250uL de Opti-MEM, se añaden 38uL del reactivo p300 y se mezcla bien por pipeteo. Posteriormente se añade la mezcla B a la mezcla A y se mezcla por pipeteo. Se incuba a temperatura ambiente de 15-25 minutos para que se formen los complejos y una vez pasado este tiempo se añade directamente por goteo a las células Lenti-X 293T con Opti-MEM. Se dejan incubar durante 5-6 horas, se retira el medio con los complejos de transfección y se cambia por medio de proliferación. A partir de este momento se inicia la producción de los lentivirus y se cuentan de

48-72 horas para recuperar el sobrenadante donde se encontrarán los lentivirus que serán utilizados para la transducción.

Se sembraron 12 cajas de 100mm con 750,000 células C2C12-PRR-Nr4a3 con medio de proliferación durante 48 horas previas a la recuperación de los lentivirus. De igual forma se sembraron 12 cajas de 100mm con 750,000 células C2C12-GAL4 con medio de proliferación durante 48 horas previas a la recuperación de los lentivirus. Una vez recuperado el sobrenadante lentiviral de 8 cajas se centrifuga a 1000rpm/4°C/5 minutos para sedimentar cualquier remanente de células Lenti-X. Se recupera el sobrenadante en otro tubo y se le añade SFB a un 10% y polybrene a una concentración final de 10ug/mL. Se reemplaza el medio de las 12 cajas C2C12-PRR-Nr4a3 y de las 12 cajas C2C12-GAL4 con 2mL de Opti-MEM y se le añaden 2.8mL de esta mezcla Lentiviral, se incuba a 37°C/5% CO2 durante 36 horas y se cambia por medio de proliferación.

6.5 Confirmación de la eficiencia del sistema CAPTURE mediante geles desnaturalizantes

Extracción de núcleos

Una vez que las células transducidas con la dCas9 llegan a confluencia de 80-90% se cambia el medio de proliferación por medio de diferenciación y se lleva a cabo el tratamiento con Epicatequina y DMSO. Cumplidas las 120hrs de diferenciación se lavan 2 veces con PBS frío y se recuperan con ayuda de una espátula para ser transferidos a un tubo de 15mL. Es posible juntar las células de 2 cajas de 100mm en un tubo para ser procesadas en conjunto.

Previamente se preparan las soluciones:

Soluciones Stock	Buffer NI	Buffer de Lisis
Tris-HCl 1M pH 7.5	15 mM	15 mM
Sacarosa 900 mM	300 mM	300 mM
HEPES 150 mM	10 mM	10 mM
KCl 900 mM	60 mM	60 mM
MgCl ₂ 40 mM	4 mM	4 mM
NaCl 450 mM	5 mM	5 mM
DTT 1M	1mM	1mM
NP-40	-	0.8%

**Las soluciones de trabajo deben almacenarse y utilizarse en frío.

Se centrifugan las células a 1000rpm/4°C/5 minutos. Se decanta el sobrenadante y se añaden 2mL de buffer Ni, se resuspende el pellet celular y se añaden 2mL de buffer de Lisis. Se mezcla por pipeteo y se deja incubar durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se mezcla por pipeteo y se transfiere a un homogenizador, se le dan 40 golpes y se recuperan los núcleos a un tubo nuevo de 15mL. Se centrifuga a 1000rpm/4°C/5 minutos, se decanta el sobrenadante, se observa una alícuota de 10uL en el microscopio para asegurarse de que los núcleos se hayan liberado de los miotubos y se entrecruzan en 2mL de PBS con 1% de formaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se detiene el entrecruzamiento añadiendo Glicina a una concentración final de 0.125M e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo se centrifugan a 1000rpm/4°C/5 minutos se decanta el sobrenadante y se realiza un lavado con PBS frío, se vuelve a centrifugar a las mismas condiciones y se vuelve a observar una alícuota de 10uL en el microscopio para asegurar que los núcleos no se hayan dado durante este proceso.

En este punto los núcleos pueden ser almacenados en seco a -80°C para ser procesados posteriormente.

Estandarización del tamaño de los fragmentos de cromatina

Debido a que el tamaño de los fragmentos de cromatina puede variar dependiendo las condiciones y el equipo de sonicación, es necesario estandarizar esta condición para asegurar que el rango de tamaño oscile entre los 500-1000pb.

Se prepara previamente la siguiente solución:

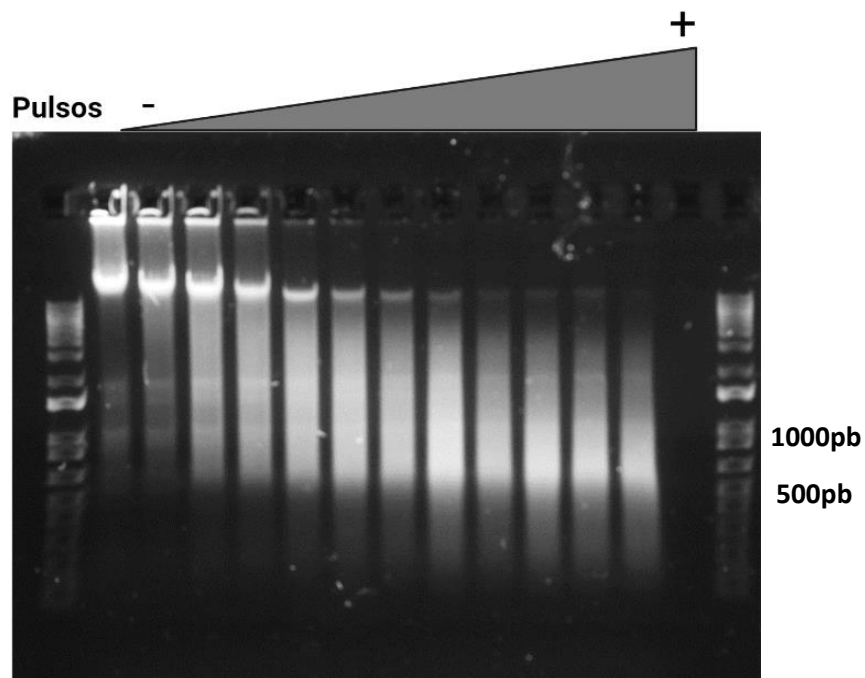
Soluciones Stock	Buffer de Lisis Nuclear
Tris-HCl 1M pH 7.5	50 mM
EDTA 500mM	1 mM
SDS 20%	0.5%

Se resuspenden los núcleos extraídos en 400uL de Buffer de Lisis nuclear y se mantiene el tubo en hielo durante los pasos siguientes. En este caso se usó un sonicador Sonics VCX 130 y la condición utilizada fue 5 segundos de pulso con 10 segundos de descanso. Las células se someten a 11 pulsos y entre cada uno se tomó una alícuota de 25uL para analizar los tamaños de cromatina fragmentada.

Una vez terminados los 11 pulsos se trata cada alícuota añadiendo 2uL de NaCl 5M, 2uL de Proteinasa K (10ug/uL) y 0.5uL de RNasa (1ug/uL), se mezcla bien por pipeteo y se incuba a 65°C de 3-4 horas para revertir el entrecruzamiento.

Posteriormente se lleva a cabo una extracción rápida con Fenol:Cloroformo y el DNA extraído se carga a un gel de agarosa al 1% para observar los tamaños obtenidos con cada uno de los 11 pulsos realizados. Como resultado se obtuvo que la condición que beneficia más para obtener fragmentos de cromatina de 500 a 1000 pb es de 11 pulsos de 5 segundos y 10 segundos de descanso a una amplitud de 30%.

Una vez obtenida la condición de sonicación se procede a trabajar con los núcleos previamente recuperados.



Purificación del sistema CAPTURE

Previamente se deben preparar las siguientes soluciones.

Buffer RIPA	Buffer de Lisis celular	Buffer 8M Urea	Buffer de unión IP	Buffer de unión IP sin NaCl
50mM Tris-HCl (pH 7.4)	25mM Tris-HCl (pH 7.4)	10mM Tris-HCl (pH 7.4)	20mM Tris-HCl (pH 7.5)	20mM Tris-HCl (pH 7.5)
1% NP-40	85mM KCl	1mM EDTA	150mM NaCl	1mM EDTA
0.25% Desoxicolato de Sodio (NaDOC)	0.1% Tritón X-100	8M Urea	1 mM EDTA	0.1% NP-40
150 mM NaCl			0.1% NP-40	10% Glicerol
0.1% SDS			10% Glicerol	
2 mM EDTA				

Se resuspenden los pellets nucleares en 400uL de buffer de lisis nuclear pipeteando lentamente hacia arriba y hacia abajo y se incuban durante 10 minutos a

temperatura ambiente. Se les añade 1.2 mL del buffer de Urea y se mezclan invirtiendo el tubo. Se centrifugan a 16,100×g durante 25 min a temperatura ambiente y se retira el sobrenadante por completo. Esto se repite tres veces más hasta que el sobrenadante esté claro. Después se resuspenden en 400uL de buffer de lisis nuclear pipeteando lentamente y se añade 1.2 mL de buffer de lisis nuclear para lavar la urea. Se centrifugan a 16,100×g durante 25 min a temperatura ambiente. Este paso de lavado se repite una vez más.

Una vez lavados los núcleos se resuspenden en 400uL de buffer de lisis celular pipeteando lentamente y se agrega 1.2 ml de buffer de lisis celular para lavar el SDS. Se centrifuga a 16,100×g durante 25 min a temperatura ambiente. Este paso se repite una vez más.

Se resuspende la cromatina lavada en 600uL de Buffer de unión IP sin NaCl mediante pipeteo. Se reparten 100ul en 6 tubos y cada uno se afora a 400uL con el Buffer de unión IP sin NaCl. Se toma una alícuota de 40uL de cada tubo antes de iniciar a sonicar para ser tomado como Input posteriormente en el gel de acrilamida.

Se sonica 11 veces cada tubo con pulsos de 5 seg y 10 seg de descanso. ** La condición estandarizada fue usada para 2 millones de núcleos.

Se centrifugan los tubos sonicados a 16,100×g por 5 minutos a 4°C. Se transfiere el sobrenadante de los tubos centrifugados a un tubo nuevo para inmunoprecipitar con perlas magnéticas de Estreptavidina.

Se añaden 5 M de NaCl a la cromatina fragmentada hasta una concentración final de 150 mM y se mezcla por inversión.

Antes de tomar las perlas de estreptavidina se mezclan bien vortexeandolas y se toman 50 µl de suspensión por Inmunoprecipitación. Se lavan las perlas magnéticas de estreptavidina dos veces con 1 ml de buffer de unión IP y se separan con la gradilla magnética. Se resuspenden las perlas en 25 µl de buffer de unión IP y se añade el sobrenadante con la cromatina fraccionada y se incuban los tubos a 4°C durante la noche con rotación.

Al día siguiente se recuperan las perlas con una gradilla magnética y se guarda el sobrenadante que contiene las proteínas no unidas.

Se resuspenden las perlas en 1 ml de buffer de unión IP (se deben mezclar los 2 tubos de muestra en uno solo) y se incuban durante 10 min a 4°C con rotación. Se separan las perlas con la gradilla magnética para eliminar completamente el sobrenadante. Este paso de lavado se repite 4 veces más.

Después del último lavado se vuelven a resuspender las perlas en 100 µl de buffer de unión IP. Se recuperan las perlas con la gradilla magnética y se retira el sobrenadante tanto como sea posible con una punta de pipeta.

Se agregan 30 µl de buffer RIPA y 10 µl de buffer de carga Laemmli suministrado con 6% de β-mercaptoetanol a las perlas secas. Se incuban a 95°C durante 20 min cuidando no pasar de este tiempo para evitar la degradación de proteínas. Se recuperan las perlas con la gradilla magnética y el sobrenadante es cargado en geles SDS-PAGE.

Resultados

7.1 Evaluación de la expresión de genes candidato

Tratamiento de células C2C12

Después del tratamiento de las células C2C12 durante la diferenciación con Epicatequina y DMSO, se observaron cambios morfológicos en los miotubos, siendo estos de un mayor grosor a comparación del control, como se observa en la Figura 4.

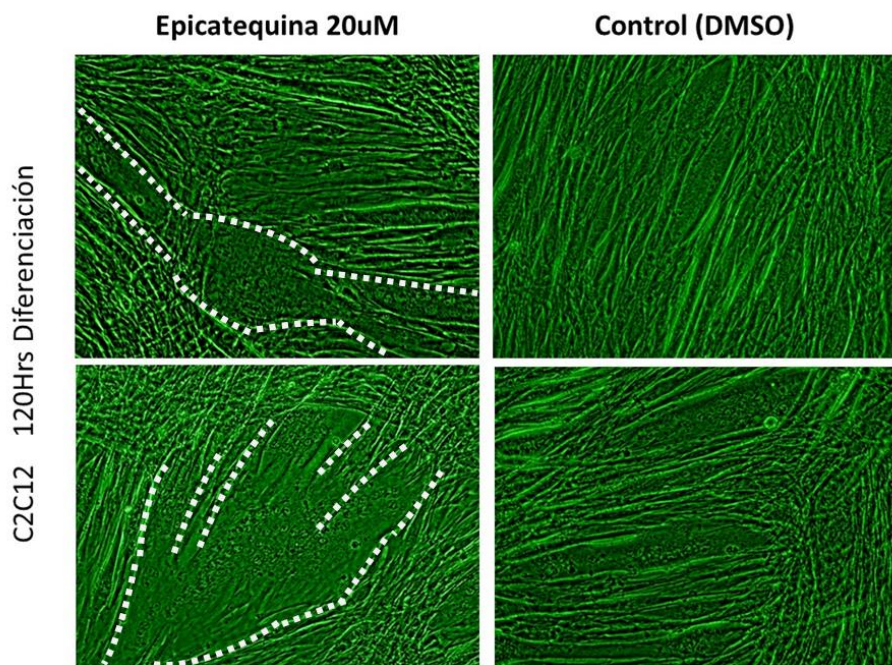


Figura 4. Miotubos C2C12 tratados durante 120 horas de diferenciación. Las líneas blancas representan el perímetro de los miotubos de mayor grosor tratados con Epicatequina.

Integridad de RNA

Una vez purificado y cuantificado el RNA se cargaron 500ng al gel de agarosa para comprobar su integridad, observando las bandas integras del RNA ribosomal 28s y 18s, por lo que estas muestras fueron utilizadas para los experimentos siguientes.

Figura 6. Gel de Agarosa al 1.5% con los productos de PCR del gen endógeno RPS18 y los genes candidato Pgc1a, Nr4a3, Perm1, Pdk4. (-) Control Negativo.

qPCR

Se utilizó el mismo cDNA para cuantificar la expresión de los genes, comparando el control con el tratamiento de epicatequina y utilizando como referencia el gen endógeno RPS18 por el método $\Delta\Delta CT$. Observando las primeras cuantificaciones se determinó que los genes candidato que representan un mayor cambio durante el tratamiento con Epicatequina son Nr4a3 y Perm1, por lo que se decidió seguir trabajando solo con estos genes. También se decidió cuantificar al gen MyoG como marcador de diferenciación.

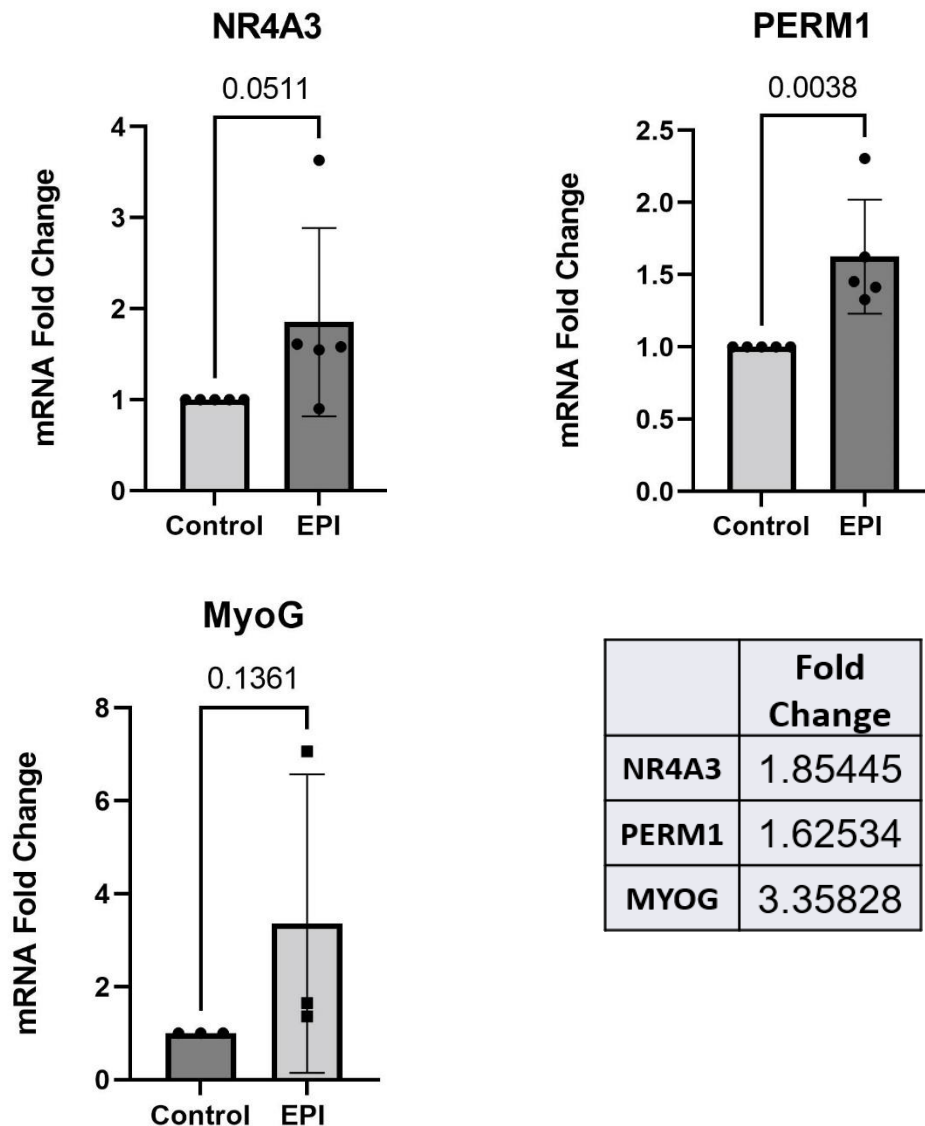


Figura 7. Gráficos de expresión de los genes blanco Nr4a3 y Perm1 con una n=5. Marcador de diferenciación MyoG con una n=3. Tabla de promedios con la razón de cambio para cada gen.

Tratamiento de células C2C12 durante diferenciación con Forskolina

Para corroborar *in vitro* que los genes NR4A3 y PERM1 modifican su expresión con la actividad física, se utilizó la molécula Forskolina la cual se ha observado que es capaz de mimetizar el ejercicio en cultivos celulares de acuerdo a lo reportado por Vinel et al. en 2018.

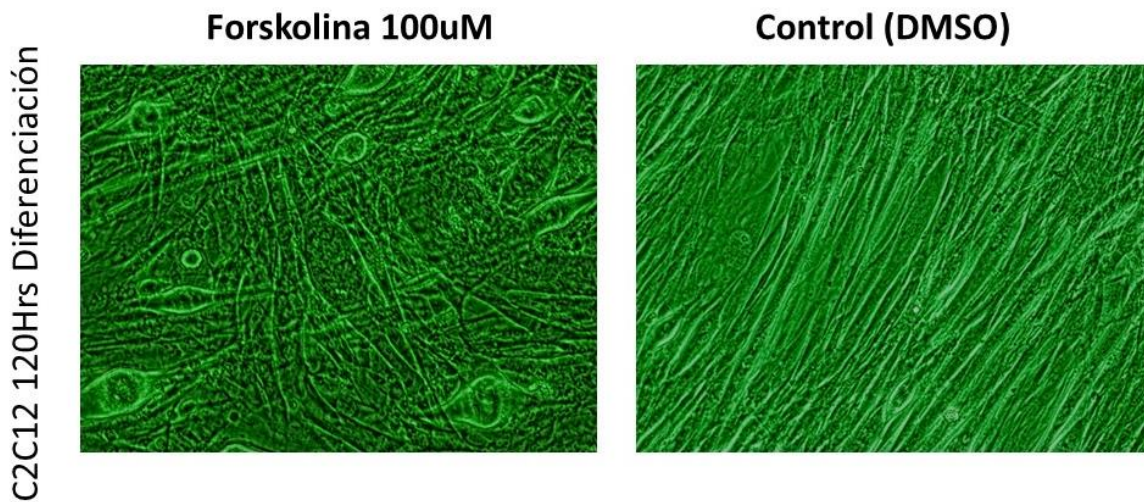


Figura 8. Miotubos C2C12 a 120 horas de diferenciación, tratados durante 48 hrs con Forskolina 100µM.

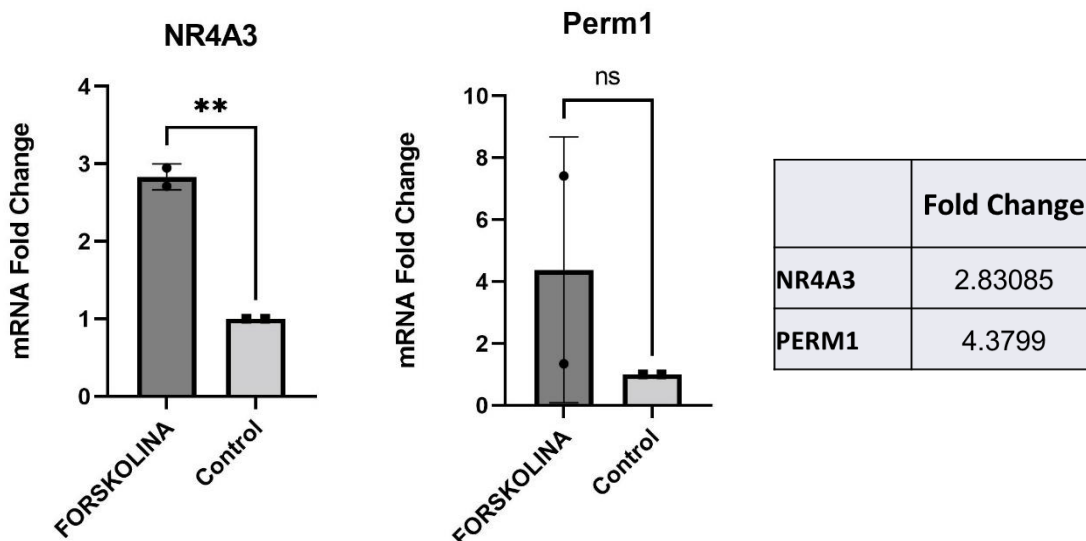


Figura 9. Gráficos de expresión de los genes blanco Nr4a3 y Perm1 con una n=5. Marcador de diferenciación MyoG con una n=3. Tabla de promedios con la razón de cambio para cada gen.

Como se puede observar en la figura 8, existe un cambio en la morfología de los miofibros tratados con Forskolina, los cuales son de un mayor grosor a diferencia de los controles, mostrando cierto grado de hipertrofia.

Con respecto a la expresión de los genes podemos observar que tanto Nr4a3 como Perm1 tienden a aumentar su expresión con Forskolina, siendo mayormente significativo el gen Nr4a3. Lo que nos indica que ambos genes responden ante el ejercicio mimetizado *in vitro* con esta molécula.

7.2 Diseño de los sgRNAs dirigidos hacia regiones de los genes blanco

Observando que los genes Nr4a3 y Perm1 siguen una tendencia a aumentar su expresión con el tratamiento de Epicatequina, se realizó el diseño de los sgRNAs para ambos genes.

sgRNAs Nr4a3

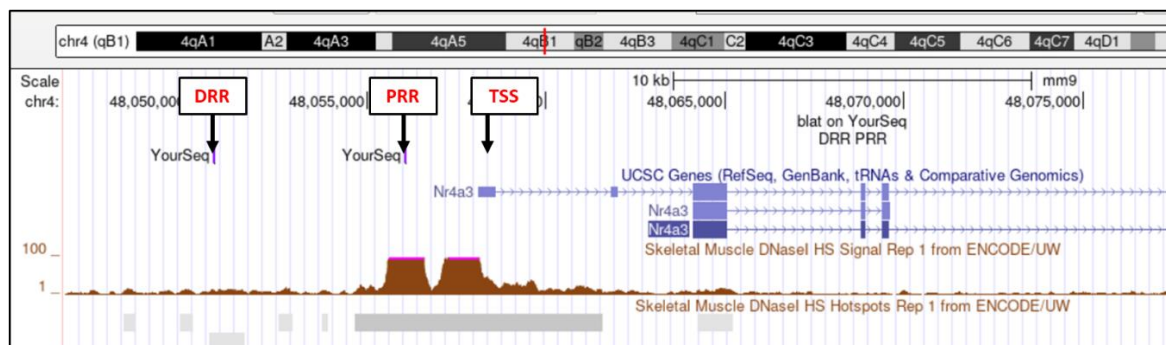


Figura 10. Regiones blanco Nr4a3. Esquema modificado, tomado de UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) donde se muestran las 3 regiones blanco TSS, PRR, DRR para el gen Nr4a3.

ID	SECUENCIA	DISTANCIA DE TSS	BLANCO
Nr4a3 DRR-sgRNA	ggagaaCCACCTTGTGGGCATGTTTATAGTTCAGTAC GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCA	7,301 pb río arriba	Región Distal Regulatoria
Nr4a3 PRR- sgRNA	ggagaaCCACCTTGTGGAGTCGGGGCGCCCTTAGCG GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCA	1,946 pb río arriba	Región Proximal Regulatoria
Nr4a3 TSS-sgRNA	ggagaaCCACCTTGTGGGCGCCCGAGAGGTTCCGC GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCA	367 pb río abajo	TSS NR4A3

Tabla 1. Primers Forward para clonar los sgRNAs del gen Nr4a3 en el vector de sobreexpresión lentiviral. En rojo se muestra la estructura del sgRNA y en negro la secuencia específica.

sgRNAs Perm1

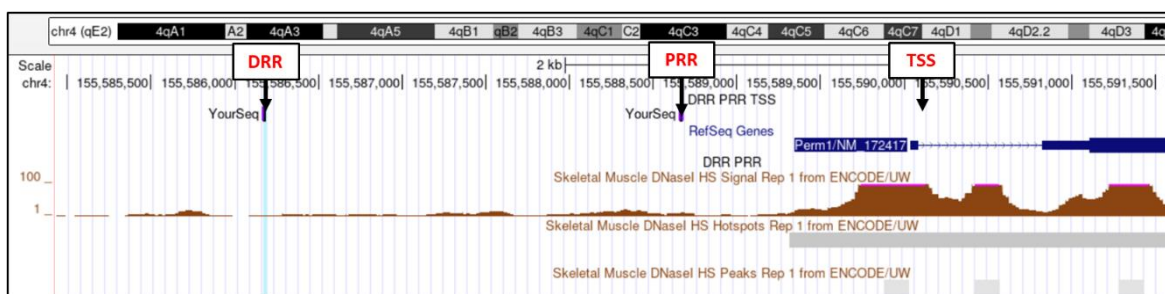


Figura 11. Regiones blanco Nr4a3. Esquema modificado, tomado de UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) donde se muestran las 3 regiones blanco TSS, PRR, DRR para el gen Nr4a3.

ID	SECUENCIA	DISTANCIA DE TSS	BLANCO
Perm1 DRR-sgRNA	ggagaaCCACCTTGTGGGGCAGATATCTGTAAATATG GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCA	3,812 pb río arriba	Región Distal Regulatoria
Perm1 PRR-sgRNA	ggagaaCCACCTTGTGGCGTGTCTTCTGAGCCGGAA GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCA	1,319 pb río arriba	Región Proximal Regulatoria
Perm1 TSS-sgRNA	ggagaaCCACCTTGTGGGGGTCAGAGACTGAAGGCTT GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCA	310 pb río abajo	TSS Perm1

Tabla 2. Primers Forward para clonar los sgRNAs del gen Nr4a3 en el vector de sobreexpresión lentiviral. En rojo se muestra la estructura del sgRNA y en negro la secuencia específica.

Control negativo

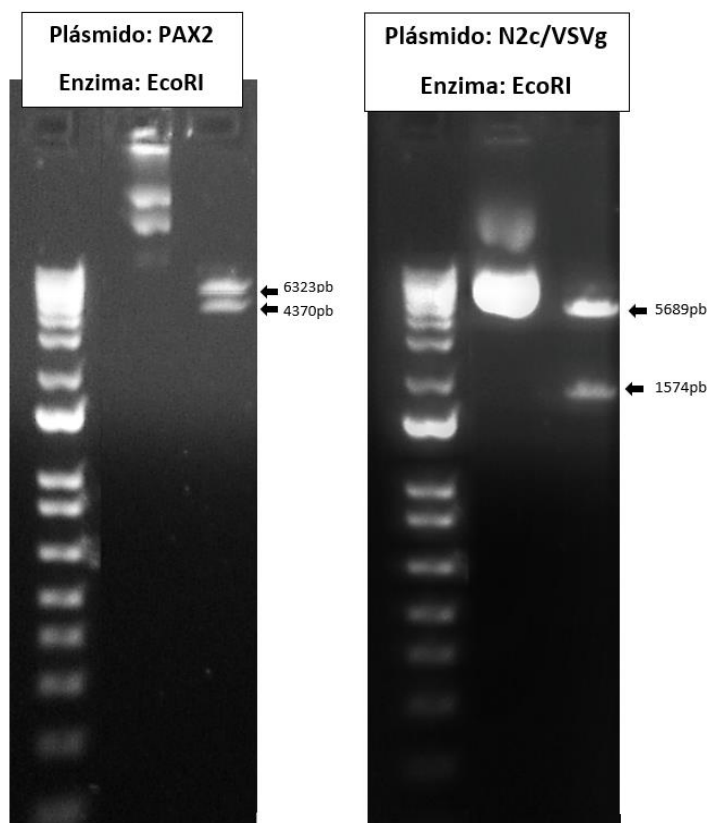
Como control negativo se utilizará el plásmido original pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 que cuenta con un sgRNA el cual no va dirigido a ninguna región del genoma de ratón.

ID	SECUENCIA	DISTANCIA DE TSS	BLANCO
sgGAL4	AACGACTAGTTAGGCGTGTA	Ninguna	Control Negativo

Tabla 3. Secuencia del sgRNA usado como control negativo.

7.3 Clonación de los sgRNA en un vector de sobre-expresión

Caracterización de los vectores por enzimas de restricción.



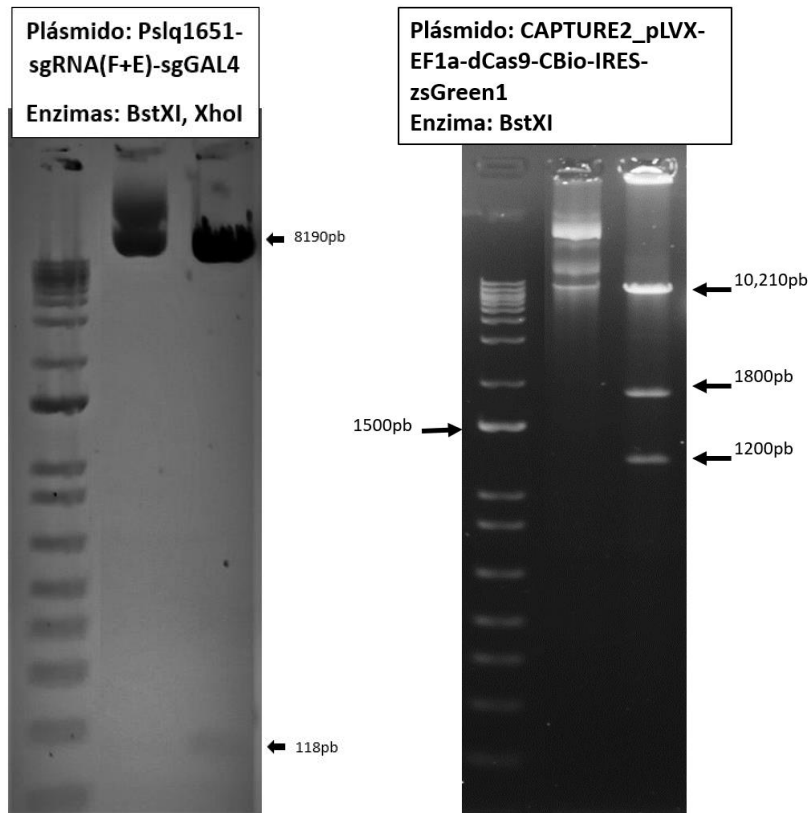


Figura 12. Geles de Agarosa al 1.2% cargados en el orden: Marcador de peso molecular 1kb, Vector sin digerir, Vector digerido para cada uno de los plásmidos caracterizados.

Cada uno de los plásmidos fue digerido correctamente, observando el patrón de bandas esperado.

Una vez identificados correctamente los plásmidos de empaquetamiento lentiviral psPAX2 y pCMV-VSV-G, así como los plásmidos de sobreexpresión lentiviral pslq1651-sgRNA(F+E)-sgGAL4 y CAPTURE2_pLVX-EF1a-dCas9-CBio-IRES-zsGreen1, se continuó con la clonación de los sgRNA.

Utilizando los Primers específicos de cada región objetivo se generó el fragmento a clonar en el vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4. Se seleccionó el gen Nr4a3 para continuar con la estrategia de captura debido a que fue el gen que aumento más su expresión, por lo que se clonaron sus 3 regiones objetivo en el vector de sobreexpresión lentiviral.

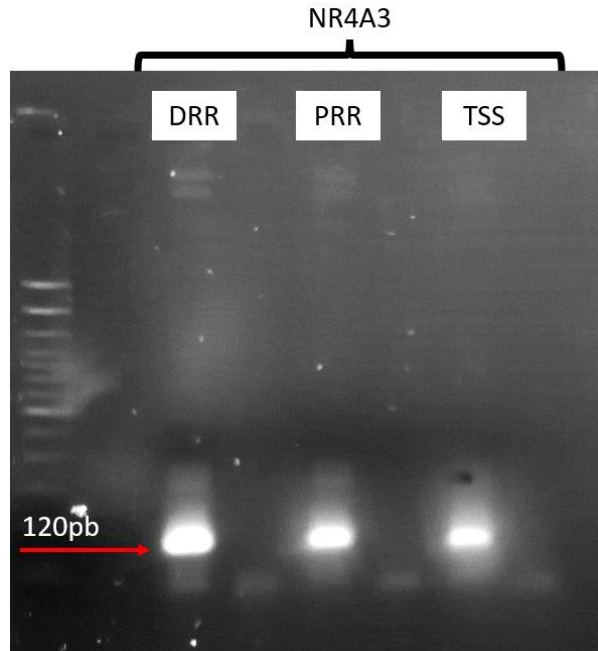


Figura 13. Gel de Agarosa 1.5% con los fragmentos a clonar, amplificados con el Primer Forward específico de cada región del gen Nr4a3.

El vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 cuenta con las siguientes características:

- Sitio de restricción para clonar sgRNA utilizando las enzimas BstXI, XhoI.
- Resistencia a Puromicina para la generación de células estables.
- Marcador mCherry para su seguimiento por fluorescencia.

Se generaron los siguientes plásmidos:

- A. pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-TSS
- B. pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-PRR
- C. pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-DRR

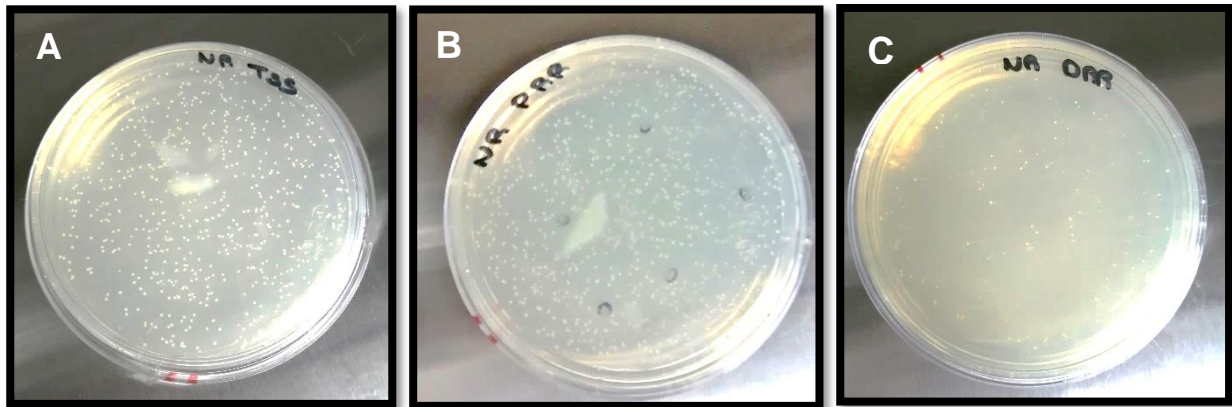


Figura 14. Cajas LB/Ampicilina plaqueadas con E.coli TOP10 transformadas con el producto de ligación de los sgRNA del gen Nr4a3 para las 3 regiones TSS,PRR,DRR.

Se seleccionaron 5 colonias de cada caja para ser probadas por PCR punto final.

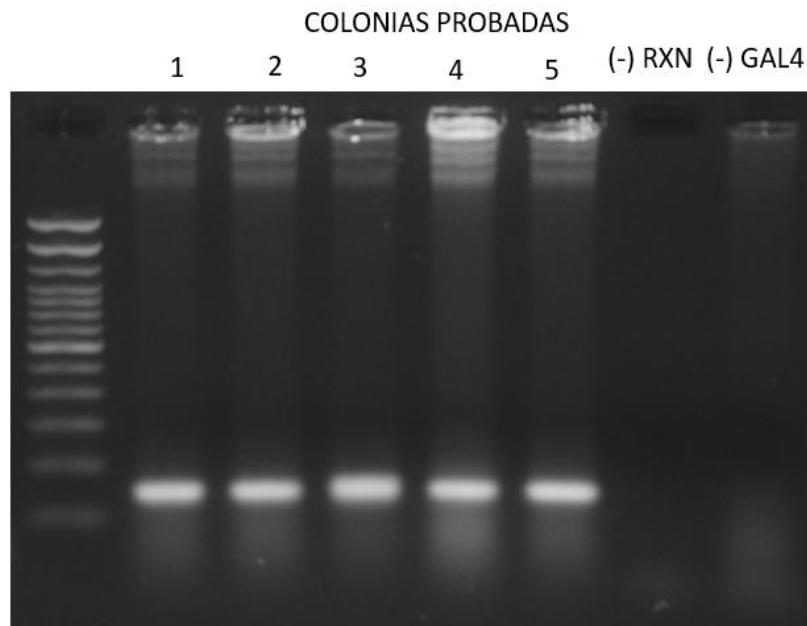


Figura 15. Gel de Agarosa 1.5%. PCR de colonia para el vector A. pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-TSS. Control (-): sin templado. Control (-)GAL4: Vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4.

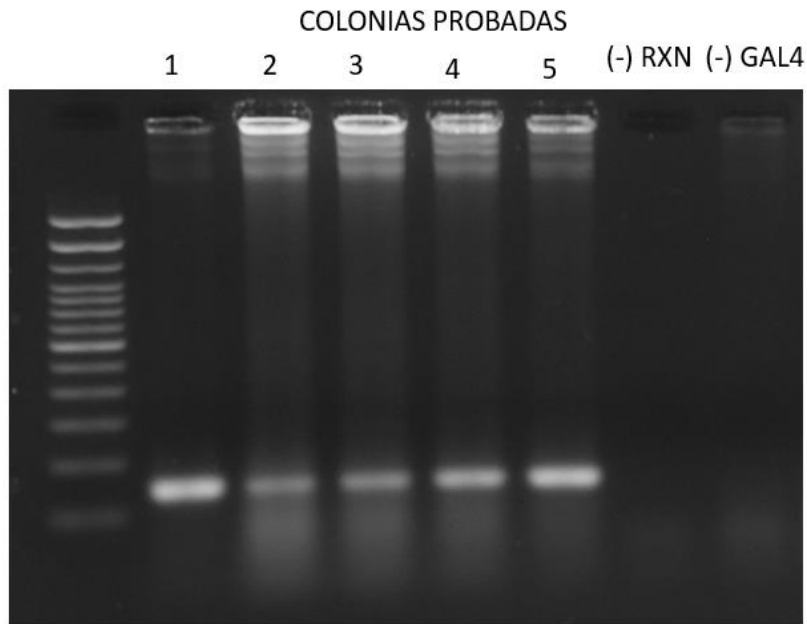


Figura 16. Gel de Agarosa 1.5%. PCR de colonia para el vector B. pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-PRR. Control (-): sin templado. Control (-)GAL4: Vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4.

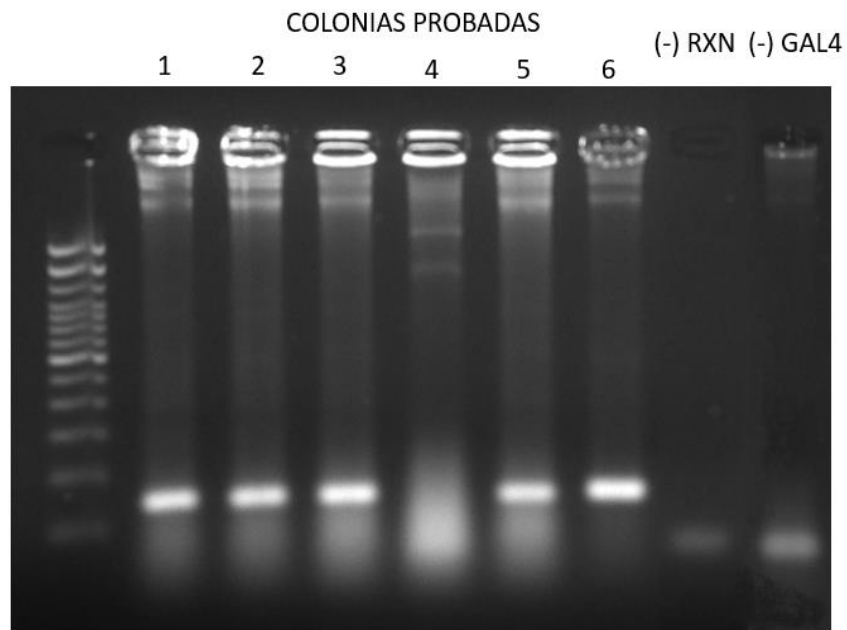


Figura 17. Gel de Agarosa 1.5%. PCR de colonia para el vector C. pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-DRR. Control (-): sin templado. Control (-)GAL4: Vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4.

La mayoría de las reacciones de PCR fueron positivas para su vector correspondiente. Una vez observado esto se tomaron dos de las colonias positivas de cada región, se extrajo el plásmido y fue secuenciado por el método de Sanger.

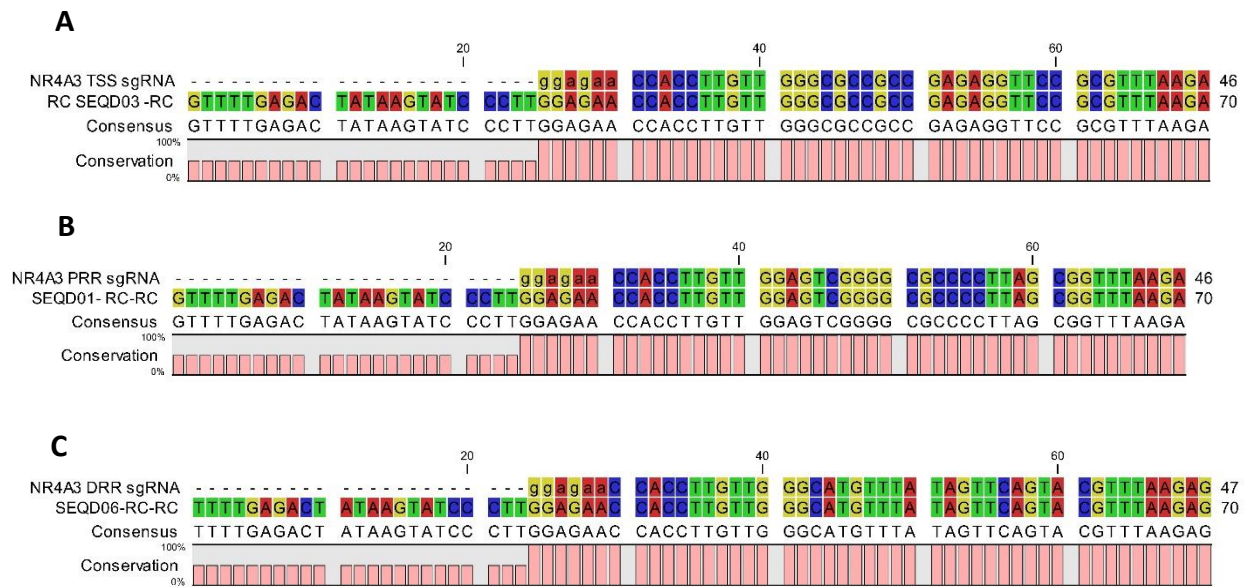


Figura 18. Alineamientos de la secuencia específica clonada y el resultado de la secuenciación por el método de Sanger. A) pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-TSS. B) pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-PRR. C) pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-DRR.

Para cada una de las regiones se obtuvo un alineamiento del 100% con la región específica clonada. Por lo que se utilizaron estos plásmidos para continuar con la producción de los lentivirus en la línea celular Lenti-X 293T.

7.4 Transducción de las células C2C12 con el vector de dCas9 y sgRNA para tratarlas durante diferenciación con epicatequina.

De los sgRNAs clonados en el vector de sobreexpresión lentiviral se seleccionó la región PRR para continuar con la generación de la línea celular estable C2C12-PRR-Nr4a3 y su control Negativo C2C12-GAL4.

Además de la resistencia de estas células al antibiótico puromicina, se observaron en el microscopio de fluorescencia para asegurarse de que estuvieran expresando al marcador m-Cherry.

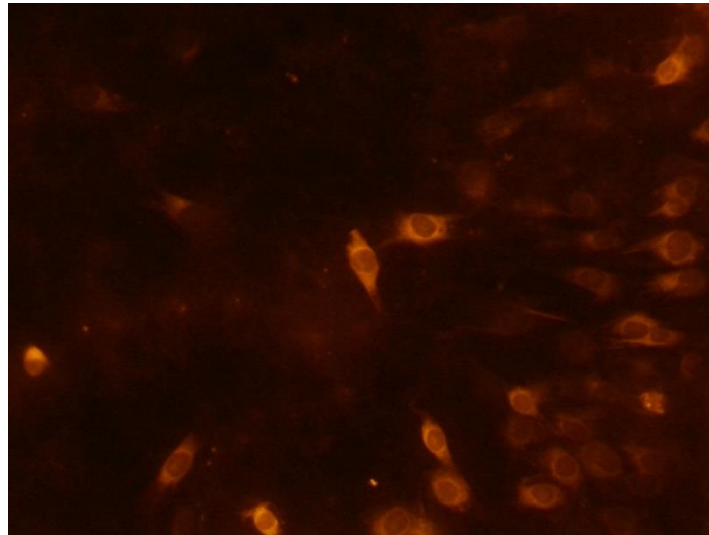


Figura 19. Mioblastos C2C12 transducidos con el vector lentiviral pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4.

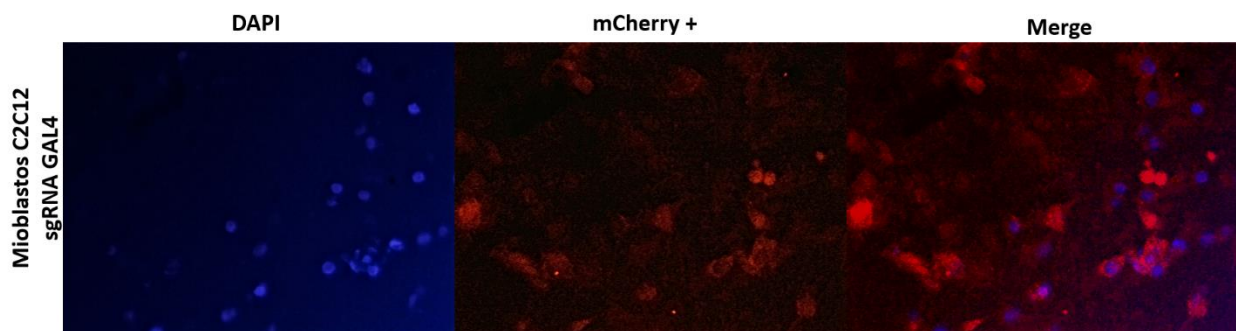


Figura 20. Mioblastos C2C12 transducidos con el vector lentiviral pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4. Co-localización de los núcleos teñidos con DAPI y la fluorescencia emitida por el marcador m-Cherry.

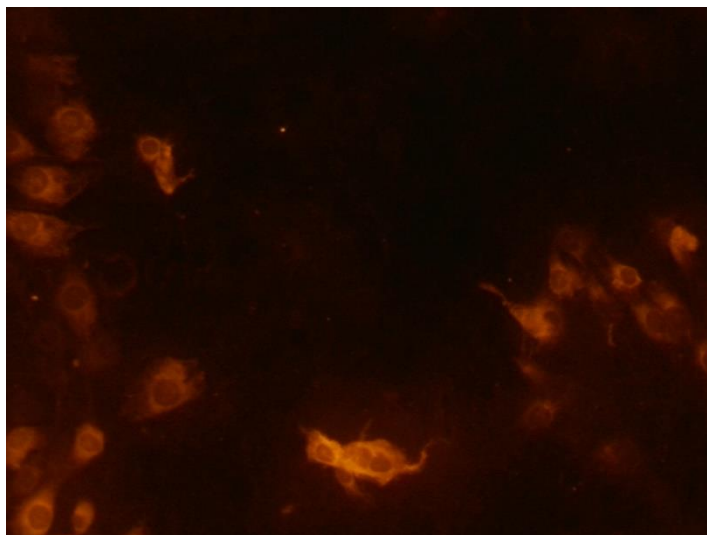


Figura 21. Mioblastos C2C12 transducidos con el vector lentiviral pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-PRR

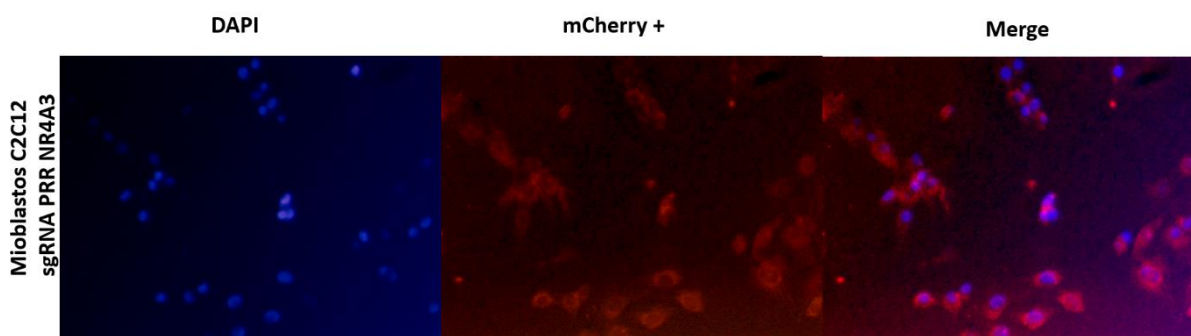


Figura 22. Mioblastos C2C12 transducidos con el vector lentiviral pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-PRR. Co-localización de los núcleos teñidos con DAPI y la fluorescencia emitida por el marcador m-Cherry.

Como se puede observar en las figuras 19 a 22, las células C2C12 transducidas tanto con el vector clonado pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgNr4a3-PRR, como con el vector utilizado como control negativo pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4, emiten la fluorescencia generada por el marcador m-Cherry y co-localizan con sus núcleos, por lo que se continuó trabajando con estas dos líneas C2C12 estables que expresan a los sgRNAs.

Se produjeron los lentivirus para expresar a la proteína dCas9 utilizando el vector plvx-EF1a-dCas9-CBio-IRES-zsGreen, el cual cuenta con las siguientes características:

- Marcador de fluorescencia zsGreen.
- Vector lentiviral.
- Expresa a la proteína dCas9 la cual esta acoplada en el extremo carboxilo a un sitio aceptor de biotina de 69 aminoácidos reconocido por ligasas de proteína-biotina eucariotas.

Se utilizaron 12×10^6 células por cada condición, teniendo 4 condiciones experimentales para ser transducidas con los lentivirus del vector plvx-EF1a-dCas9-CBio-IRES-zsGreen.

1. C2C12-GAL4 para ser tratado con Epicatequina durante la diferenciación.
2. C2C12-GAL4 para ser tratado con DMSO durante la diferenciación.
3. C2C12-PRR-Nr4a3 para ser tratado con Epicatequina durante la diferenciación.
4. C2C12-PRR-Nr4a3 para ser tratado con DMSO durante la diferenciación.

Dichos tratamientos se llevaron a cabo 24 horas después de la transducción, cambiando el medio de proliferación por medio de diferenciación suplementado con Epicatequina 20uM o DMSO.

Las células fueron recuperadas a las 120hrs de Diferenciación para continuar con la purificación del sistema de captura.

Para ambas líneas celulares se observó una reducción en la capacidad de diferenciación, sin embargo, aun se pueden observar miotubos formados a las

120hrs de Diferenciación. Por lo que se decidió utilizar estas células para realizar la purificación del sistema de captura.

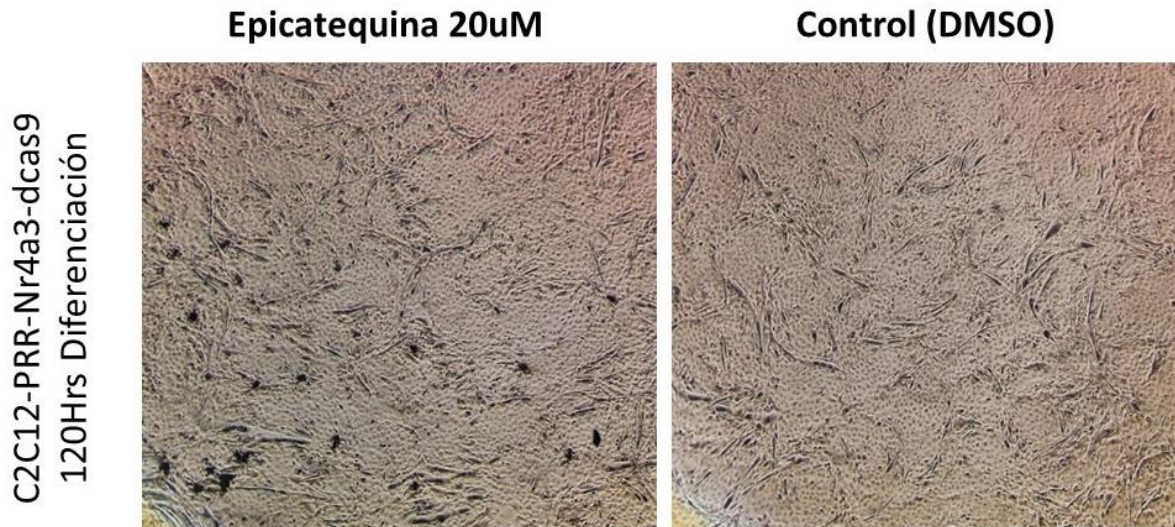


Figura 23. Miotubos C2C12-PRR-Nr4a3-dcas9 tratados con Epicatequina 20uM o DMSO durante 120 hrs de Diferenciación.

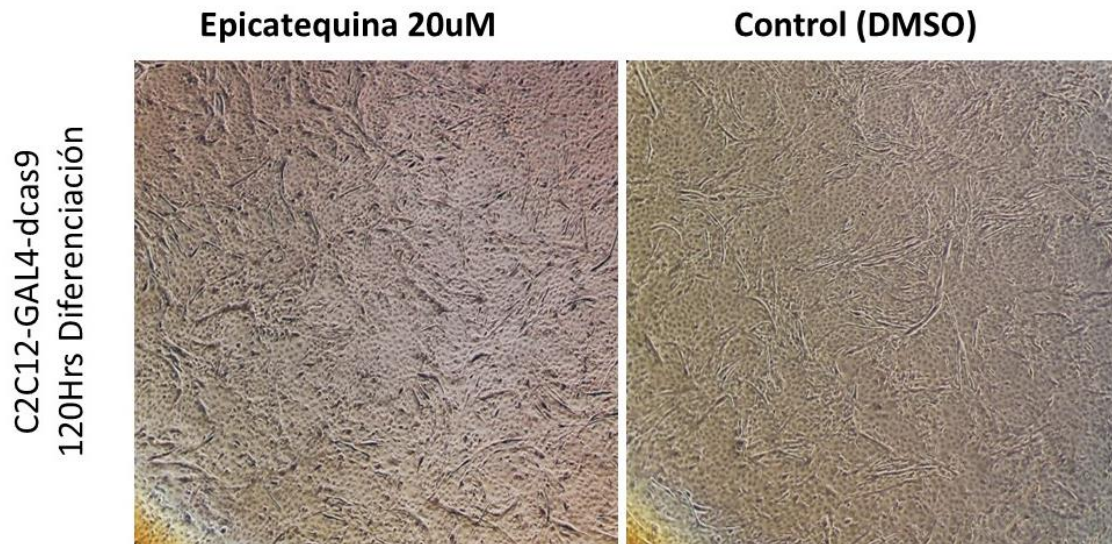


Figura 24. Miotubos C2C12-GAL4-dcas9 tratados con Epicatequina 20uM o DMSO durante 120 hrs de Diferenciación.

De igual forma previo a la recuperación de las células, estas fueron observadas en el microscopio de fluorescencia para corroborar la expresión del marcador zsGreen, indicativo de la expresión de la proteína dCas9.

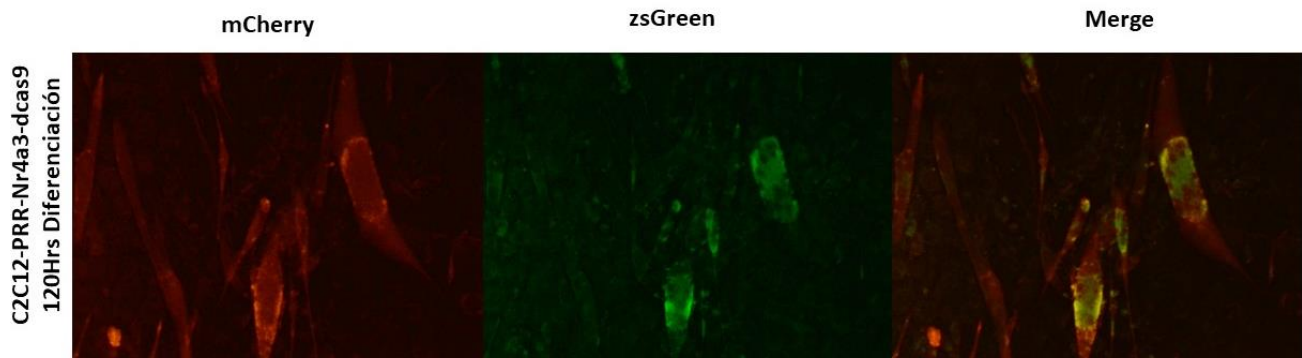


Figura 25. Fluorescencia de Miotubos C2C12-PRR-Nr4a3-dcas9 tratados con Epicatequina 20uM durante 120 hrs de Diferenciación.

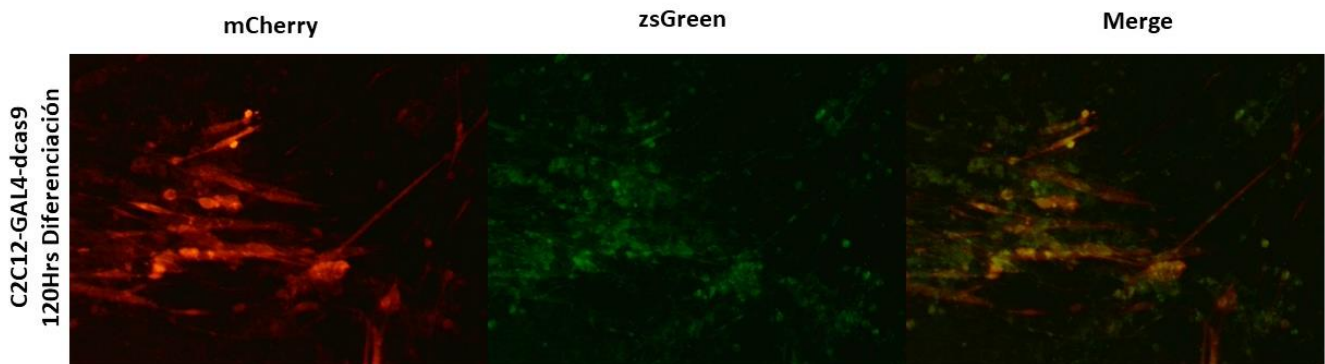


Figura 26. Fluorescencia de Miotubos C2C12-GAL4-dcas9 tratados con Epicatequina 20uM durante 120 hrs de Diferenciación.

7.5 Confirmación de la eficiencia del sistema CAPTURE mediante geles desnaturalizantes

Una vez recuperados los núcleos de las 12 millones de células para cada una de las 4 condiciones, fueron entrecruzados con formaldehído para preservar las

interacciones proteína-DNA y se realizó la purificación del sistema de captura utilizando la afinidad de la estreptavidina por la proteína dCas9 biotinilada.

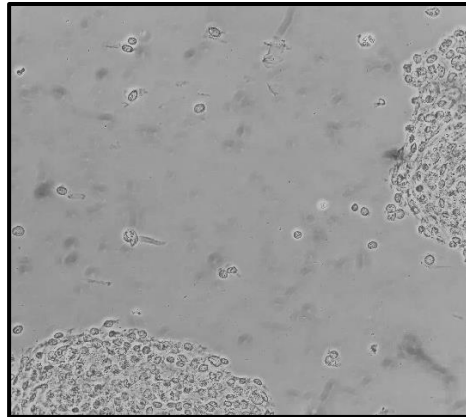


Figura 27. Microscopia de núcleos entrecruzados, extraídos de miotubos expresando el sistema CAPTURE a las 120 hrs de diferenciación.

Se analizaron las proteínas recuperadas para cada condición utilizando un gel de poliacrilamida teñido con plata.

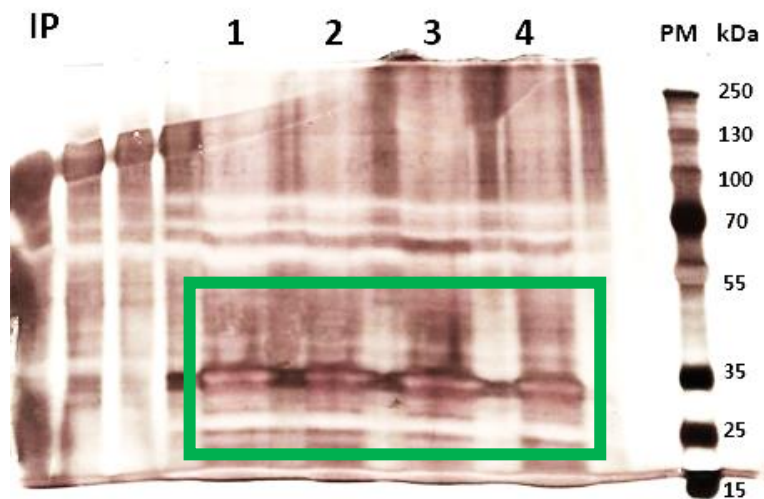


Figura 28. Gel de poliacrilamida al 12%, teñido con plata. IP: Input. 1) C2C12-GAL4-dCas9-DMSO. 2) C2C12-GAL4-dCas9-Epicatequina. 3) C2C12-PRR-Nr4a3-DMSO. 4) C2C12-PRR-Nr4a3-Epicatequina.

Los carriles 1 y 2 fueron cargados con los extractos proteicos de los sgRNAs controles tratados con DMSO y Epicatequina correspondientemente. Donde el sistema de captura no va dirigido a ninguna región objetivo del genoma de ratón. En este extracto se espera ver las proteínas de fondo, es decir, aquellas proteínas biotiniladas o que pudieron haberse purificado durante la separación con las perlas de estreptavidina. En el carril 3 y 4 se cargaron los extractos proteicos de los sgRNAs dirigidos a la región proximal del gen Nr4a3 tratados con DMSO y Epicatequina. Donde es de esperarse encontrar más proteína y observar diferencias con respecto al sgRNA control de los carriles 1 y 2.

La proteína dCas9 utilizada tienen un peso estimado de 166kDa, la cual esperaba observarse en los 4 carriles a la altura aproximada de 150kDa sin embargo, sólo se distingue una línea muy tenue, esto puede deberse a la unión no covalente pero de alta afinidad que presenta la estreptavidina por la biotina acoplada a la dCas9, por lo que es posible que la proteína se quedara acoplada a las perlas magnéticas y no se haya liberado al deshacer el entrecruzamiento.

Se observa mucho ruido de fondo debido a la sensibilidad que presentan las tinciones con plata, lo cual vuelve más complicado el análisis ya que las diferencias no son muy claras entre el control negativo y el sgRNA PRR-Nr4a3. Es de destacar que al parecer existe un enriquecimiento de proteínas entre las bandas de 35 a 55kDa para los carriles 3 y 4, pero no para los carriles 1 y 2 como se señala en la región del recuadro de la Figura 28. Lo que puede indicar que las proteínas específicas del locus PRR del gen Nr4a3 se encuentren concentradas a esta altura del gel, a un peso aproximado de 45kDa.

Debido a que las proteínas específicas que se busca purificar corresponden a Factores de transcripción, las cuales son proteínas de un bajo peso molecular y tienen un valor promedio aproximado de 50kDa, es posible que las diferencias observadas en el gel correspondan a estos Factores de transcripción específicos de esa región de regulación de Nr4a3. Para responder esta pregunta, se continuará con la identificación y análisis de la identidad de estas proteínas purificadas por espectrometría de masas para validar esta hipótesis.

Discusión

Los efectos reportados en los antecedentes acerca de los tratamientos con Epicatequina, muestran cómo esta molécula promueve el aumento de proteínas relacionadas con la función mitocondrial, así como de complejos mitocondriales de la fosforilación oxidativa en músculo esquelético. Estos reportes nos condujeron a plantear la posibilidad que los genes Nr4a3 y Perm1 también se vieran afectados en su expresión al ser tratados con epicatequina. Por ello, se decidió evaluar su expresión a nivel transcrito *in vitro*, resultando en un aumento significativo para ambos genes, al menos con una confianza estadística del 90%. Por lo que se deduce que esta molécula provoca cambios en la regulación transcripcional de dichos genes, sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo molecular que modifica su expresión.

Para resolver esa incógnita la mejor estrategia es analizar los elementos de regulación transcripcional de cada gen y observar sus diferencias con y sin tratamiento de epicatequina, esperando observar un reclutamiento diferencial de estos factores de transcripción que funcionan como elementos de respuesta ante el tratamiento.

Resulta complicado analizar los elementos asociados a una región específica de regulación del ADN, sin tener factores de transcripción candidatos responsables de su posible regulación. Por esta razón, se utilizó el sistema CAPTURE debido a su especificidad y capacidad de inmunoprecipitar complejos de cromatina tan solo dirigiendo este sistema a una secuencia específica del genoma.

Esta estrategia CAPTURE presenta algunas ventajas a diferencia de otras estrategias utilizadas para identificar proteínas asociadas a complejos de cromatina. El uso de anticuerpos dirigidos a una proteína conocida para inmunoprecipitar los complejos de cromatina, puede resultar en la detección de complejos de otras regiones del genoma además de nuestra región de interés, dado que los anticuerpos van dirigidos a una proteína que puede localizarse en varios loci que no son los de

interés, lo cual hace que este método sea inespecífico y adicionalmente requiere del conocimiento previo de moléculas detectadas en este locus.

Aprovechando la capacidad de este sistema de purificar las proteínas asociadas a una región de cromatina específica, se diseñaron sgRNAs dirigidos hacia las regiones reguladoras de la transcripción del gen Nr4a3, específicamente se utilizó el sgRNA que dirige a una región reguladora proximal. Dichas proteínas purificadas fueron analizadas por medio de un gel desnaturizante, el cual fue teñido con plata para lograr observar estas proteínas y sus modificaciones con una mayor resolución.

Debido a que el gel teñido presenta mucho ruido de fondo, es complicado realizar un análisis cualitativo del mismo, sin embargo, parece ser que aproximadamente a la altura de 45kDa existe un enriquecimiento de proteínas, el cual no se observa con el control negativo. Es probable que estas bandas de proteínas de bajo peso molecular pertenezcan a los factores de transcripción específicos de la región proximal de regulación, sin embargo, aún no es posible asegurar esto.

Se debe repetir este gel desnaturizante, cuidando el tiempo de tinción para que exista una menor cantidad de ruido de fondo y las bandas tengan una mayor resolución para corroborar esta suposición. Una vez confirmadas estas diferencias se deben identificar las proteínas de cada muestra por espectrometría de masas y realizar la comparativa a nivel cualitativo, esperando encontrar esas diferencias ya sea a nivel proteína o incluso en sus modificaciones postraduccionales.

Para este trabajo se logró identificar genes que responden ante el ejercicio y que también responden de manera positiva ante el tratamiento con epicatequina, se estandarizó el diseño y clonación de los sgRNAs en el vector de sobreexpresión lentiviral, se estandarizaron las condiciones de producción de los lentivirus utilizando el vector control y clonado en la línea celular Lenti-X 293T. Se establecieron las condiciones de transducción de la línea celular C2C12 para expresar a los sgRNAs y a la proteína dCas9, los cuales fueron seguidos con los marcadores de fluorescencia y resistencia a antibiótico. Se estandarizó la extracción de núcleos de las células C21C2 diferenciadas, ya que los miotubos suelen ser más

resistentes y puede resultar complicada su purificación. Se estandarizaron las condiciones de fragmentación de cromatina para recuperarla en el rango de tamaño requerido. Se inmunoprecipito a la proteína dcas9 biotinilada guiada a la región proximal de regulación del gen Nr4a3 y se observó el extracto proteico en un gel desnaturizante.

Conclusiones

- En este trabajo se logró evaluar por métodos cuantitativos la expresión de genes candidato, Nr4a3 y Perm1, importantes en el metabolismo oxidativo del músculo esquelético para los cuales no se tienen reportes previos de sus niveles de expresión en células C2C12 tratadas con epicatequina durante su diferenciación.
- Los análisis de qPCR nos permitieron seleccionar al gen Nr4a3 para su estudio a nivel molecular del mecanismo por el cual epicatequina promueve su expresión.
- Se diseñaron sgRNAs dirigidos a 3 regiones de regulación por medio de análisis bioinformáticos de accesibilidad de DNasa y predicción de elementos regulatorios en cis (CREs).
- Los sgRNAs fueron clonados a un vector de sobreexpresión lentiviral y validados correctamente por secuenciación con el método de Sanger. Uno de los plásmidos clonados con el sgRNA dirigido a la región proximal de regulación del gen Nr4a3 fue utilizado para estandarizar las condiciones óptimas de producción de lentivirus utilizando la línea celular Lenti-X 293T.
- Los lentivirus producidos fueron utilizados para transducir correctamente a mioblastos C2C12 y generar una línea celular estable que expresara a este sgRNA.
- Esta línea celular estable se utilizó para ser transducida nuevamente con un vector de expresión de la proteína dCas9 y se validó siguiendo el marcador de fluorescencia zsGreen para ser diferenciadas y tratadas con epicatequina.
- Una vez pasado el tiempo establecido de tratamiento se logró extraer los núcleos de las células diferenciadas expresando el sistema de captura y se purificó la cromatina de esta región. Las proteínas recuperadas fueron analizadas mediante un gel desnaturizante teñido con plata.

Perspectivas

Debido a la complejidad de este proyecto existen algunos experimentos de validación que por cuestiones de tiempo no pudieron ser realizados.

Para conocer la eficiencia de transducción de los lentivirus generados a las condiciones establecidas, se debe realizar un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que nos permitirá conocer cual es la proporción de células positivas que expresan al marcado de fluorescencia mCherry y zsGreen, esto nos permitirá aumentar la eficiencia, de ser necesario, añadiendo una mayor cantidad de lentivirus y recuperar más células que expresen el sistema completo.

Para asegurarnos de que la proteína dCas9 se esta expresando en las células transducidas se deberá realizar una extracción de RNA para cuantificar la expresión a nivel transcrito por qPCR. Incluso se pueden evaluar distintas condiciones para asegurar que exista una buena expresión de la proteína. Para asegurarnos de que también se esta expresando a nivel proteico, es necesario realizar un Western Blot con un anticuerpo específico que nos permita detectar a la dCas9 en geles desnaturizantes.

El gel desnaturizante con las proteínas recuperadas del locus específico debe ser repetido disminuyendo la cantidad de proteína cargada para asegurar que exista un menor ruido de fondo y que podamos observar patrones claros.

Las proteínas recuperadas deberán ser analizadas por espectrometría de masas para identificarlas, compararlas entre condiciones y analizar sus diferencias. Esto nos permitirá relacionarlas con las vías de señalización que desencadenan esta respuesta generada por el tratamiento con epicatequina.

Anexos

11.1 Datos de qPCR

Lista de Primers utilizados en PCR punto final y qPCR

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
Rps18	GGGAAAATAGCCTTCGCCATCA	ATCACTCGCTCCACCTCATCCT
Pdk4	GGATTACTGACCGCCTCTTTAG	CCATAACCAAAACCAGCCAAA
Pgc1 α	AACCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCTGTTTTCTG
Perm1	GAGTCAGGCTTGGATCTTTCTAC	GAGTCAGGCTTGGATCTTTCTAC
Nr4a3	AAACGTGGCGACATCCTAC	GCTGCGATCCCAACTCAT

Datos correspondientes a los experimentos utilizados para evaluar la expresión de los genes candidato

C2C12 DIF 120 HORAS EXPERIMENTO 1						
		PROMEDIO				
RSP18	DMSO	18.45				
	EPI	20.31				
			RESTA			
			Δ CT		$\Delta\Delta$ CT	Fold Change
MYH7	DMSO	22.2	3.75			1
	EPI	24.76	4.45		0.7	0.61557221
NR4A3	DMSO	25.65	7.2			1
	EPI	27.66	7.35		0.15	0.90125046
PERM1	DMSO	26.35	7.9			1
	EPI	27.67	7.36		-0.54	1.45397252
MYOG	DMSO	17.96	-0.49			1
	EPI	17	-3.31		-2.82	7.06162397
MYH4	DMSO	17.27	-1.18			1
	EPI	20.31	0		1.18	0.4413515

C2C12 DIF 120 HORAS EXPERIMENTO 2						
		PROMEDIO				
RSP18	DMSO	21.16				
	EPI	23.06				
			RESTA			
			Δ CT		$\Delta\Delta$ CT	Fold Change
MYH7	DMSO	25.23	4.07			1
	EPI	25.99	2.93		-1.14	2.20381023
NR4A3	DMSO	28.95	7.79			1
	EPI	30.19	7.13		-0.66	1.58008262
PERM1	DMSO	29.05	7.89			1
	EPI	30.45	7.39		-0.5	1.41421356
MYOG	DMSO	19.16	-2			1
	EPI	20.34	-2.72		-0.72	1.64718203
MYH4	DMSO	20.39	-0.77			1
	EPI	22.16	-0.9		-0.13	1.0942937

C2C12 DIF 120 HORAS EXPERIMENTO 3						
		PROMEDIO				
RSP18	DMSO	29.63				
	EPI	30.73				
			RESTA			
			Δ CT		$\Delta\Delta$ CT	Fold Change
PGC1a	DMSO	33.62	3.99			1
	EPI	34.54	3.81		-0.18	1.13288389
NR4A3	DMSO	33.81	4.18			1
	EPI	34.22	3.49		-0.69	1.61328352
PERM1	DMSO	36	6.37			1
	EPI	36.4	5.67		-0.7	1.62450479
CNDP2	DMSO	37.63	8			1
	EPI	38.42	7.69		-0.31	1.2397077
TFAM	DMSO	32.41	2.78			1
	EPI	32.6	1.87		-0.91	1.8790455

C2C12 DIF 120 HORAS EXPERIMENTO 3						
		PROMEDIO				
RSP18	DMSO	26.36				
	EPI	26.71				
			RESTA			
MyoD	DMSO	28.69	2.33			1
	EPI	26.68	-0.03		-2.36	5.13370359
MyoG	DMSO	23.72	-2.64			1
	EPI	23.62	-3.09		-0.45	1.36604026

C2C12 DIF 120 HORAS EXPERIMENTO 4						
		PROMEDIO				
RSP18	DMSO	20.15				
	EPI	20.32				
			RESTA			
			Δ CT		$\Delta\Delta$ CT	Fold Change
NR4A3	DMSO	32.16	12.01			1
	EPI	31.7	11.38		-0.63	1.54756499
PERM1	DMSO	32.41	12.26			1
	EPI	32.17	11.85		-0.41	1.32868581
PGC1a	DMSO	30.96	10.81			1
	EPI	31.03	10.71		-0.1	1.07177346

C2C12 DIF 120 HORAS EXPERIMENTO 5						
		PROMEDIO				
RSP18	DMSO	25.265				
	EPI	24.405				
			RESTA			
			Δ CT		$\Delta\Delta$ CT	Fold Change
NR4A3	DMSO	35.05	9.785			1
	EPI	32.33	7.925		-1.86	3.63007662
PERM1	DMSO	34.185	8.92			1
	EPI	32.12	7.715		-1.205	2.30537269
TFAM	DMSO	29.865	4.6			1
	EPI	27.215	2.81		-1.79	3.45814893

Bibliografía

- Akimoto, T., Pohnert, S. C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P. B., ... Yan, Z. (2005). Exercise Stimulates Pgc-1 Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19587–19593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408862200>
- Alway, S. E., Bennett, B. T., Wilson, J. C., Sperringer, J., Mohamed, J. S., Edens, N. K., & Pereira, S. L. (2015). Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse , but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats. *Applied Physiology*, 118(3), 319–330. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00674.2014>
- Augusto, V., Padovani, C. R., Eduardo, G., & Campos, R. (2004). Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice, 21, 89–94.
- Bock, T., Türk, C., Aravamudhan, S., Keufgens, L., Bloch, W., Rozsivalova, D. H., ... Krüger, M. (2021). PERM1 interacts with the MICOS-MIB complex to connect the mitochondria and sarcolemma via ankyrin B. *Nature Communications*, 12(4900), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25185-3>
- Cho, Y., Tachibana, S., Hazen, B. C., Moresco, J. J., Iii, J. R. Y., Kok, B., ... Kralli, A. (2019). Perm1 regulates CaMKII activation and shapes skeletal muscle responses to endurance exercise training. *Molecular Metabolism*, 23(February), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.02.009>
- Dowling, J. J., Weihl, C. C., & Spencer, M. J. (2021). Molecular and cellular basis of genetically inherited skeletal muscle disorders. *Molecular Cell Biology*, 22, 713–732. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00389-z>
- Handschin, C., Chin, S., Li, P., Liu, F., Maratos-flier, E., Lebrasseur, N. K., ... Spiegelman, B. M. (2007). Skeletal Muscle Fiber-type Switching , Exercise Intolerance , and Myopathy in PGC-1 Muscle-specific Knock-out Animals. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30014–30021.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M704817200>

Hosoi, T., Yakabe, M., Sasakawa, H., Sasako, T., & Ueki, K. (2023). Sarcopenia phenotype and impaired muscle function in male mice with fast-twitch muscle-specific knockout of the androgen receptor. *PNAS*, *120*(4).

<https://doi.org/10.1073/pnas>.

Joseph, J. S., Anand, K., Malindisa, S. T., Oladipo, A. O., & Fagbohun, O. F. (2021). EXERCISE , CAMKII , AND TYPE 2 DIABETES. *EXCLI Journal*, *(20)*, 386–399.

Kim, A. R., Min, K., Ran, M., Hwang, J., Il, J., Taek, H., ... Hong, J. (2017). Catechins activate muscle stem cells by Myf5 induction and stimulate muscle regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *489*(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.114>

Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C., & Wu, Z. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 a drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, *418*(August), 797–801. <https://doi.org/10.1038/nature00936.1>.

Liu, X., Chen, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, N., Botten, G. A., ... Xu, J. (2020). Multiplexed capture of spatial configuration and temporal dynamics of locus-specific 3D chromatin by biotinylated dCas9. *Genome Biology*, *21*(59), 1–20.

Liu, X., Zhang, Y., Chen, Y., Li, M., Shao, Z., Zhang, M. Q., & Xu, J. (2018). CAPTURE : In Situ Analysis of Chromatin Composition of Endogenous Genomic Loci by Biotinylated dCas9. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1–24. <https://doi.org/10.1002/cpmb.64>

Liu, X., Zhang, Y., Chen, Y., Li, M., Zhou, F., Li, K., ... Xu, J. (2017). In situ Capture of Chromatin Interactions by Biotinylated dCas9. *Cell*, *170*(5), 1028–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.003>

Maltzahn, J. Von, Jones, A. E., Parks, R. J., & Rudnicki, M. A. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *PNAS*, *110*(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.1307680110>

- Mauro, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J Biophys Biochem Cytol.*, 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
- Mcdonald, C. M., Ramirez-sanchez, I., Joyce, N., Candace, D. O., Bs, A., Nicorici, A., ... Henricson, E. K. (2021). (-) -Epicatechin induces mitochondrial biogenesis and markers of muscle regeneration in adults with Becker muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*, (63), 239–249. <https://doi.org/10.1002/mus.27108>
- Morgan, P. T., Smeuninx, B., Breen, L., & Breen, L. (2020). Exploring the Impact of Obesity on Skeletal Muscle Function in Older Age. *Frontiers in Nutrition*, 7(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.569904>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle : A review of molecular structure and function , in health and disease. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 12, 1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Nogueira, L., Ramirez-sanchez, I., Perkins, G. A., Murphy, A., Taub, P. R., Ceballos, G., ... Malek, M. H. (2011). (–) -Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *The Physiological Society*, 18, 4615–4631. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209924>
- Pearen, M. A., Goode, J. M., Fitzsimmons, R. L., Eriksson, N. A., Thomas, G. P., Cowin, G. J., ... Muscat, G. E. O. (2013). Transgenic Muscle-Specific Nor-1 Expression Regulates Multiple Pathways That Effect Adiposity, Metabolism, and Endurance. *Molecular Endocrinology*, 27(November), 1897–1917. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1205>
- Pearen, M. A., Myers, S. A., Raichur, S., Ryall, J. G., Lynch, G. S., & Muscat, G. E. O. (2008). The Orphan Nuclear Receptor , NOR-1 , a Target of α -Adrenergic Signaling , Regulates Gene Expression that Controls Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle. *Endocrinology*, 149(6), 2853–2865. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1202>
- Pillon, N. J., Gabriel, B. M., Dollet, L., Smith, J. A. B., Puig, L. S., Botella, J., ... Zierath, J. R. (2020). Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to

- exercise and inactivity. *Nature Communications*, 11(470).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13869-w>
- Plotkin, D., Roberts, M., Haun, C., & Schoenfeld, B. (2021). Muscle Fiber Type Transitions with Exercise Training : Shifting Perspectives. *Sports*, 9(127), 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/sports9090127>
- Ramirez-sanchez, I., Santos, S. D. L., Gonzalez-basurto, S., Canto, P., Zentelladehesa, A., & Coral-vazquez, R. (2014). Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic d - sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS*, 281, 5567–5580.
<https://doi.org/10.1111/febs.13098>
- Rugowska, A., Starosta, A., & Konieczny, P. (2021). Epigenetic modifications in muscle regeneration and progression of Duchenne muscular dystrophy. *Clinical Epigenetics*, 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01001-z>
- Sala, D., & Zorzano, A. (2016). *Impact of Type 2 Diabetes on Skeletal Muscle Mass and Quality. Molecular Nutrition and Diabetes*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801585-8.00007-5>
- Schiaffino, S. (2018). Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies.pdf. <https://doi.org/doi:10.1111/febs.14502>
- Selsby, J. T., Morine, K. J., Pendrak, K., Barton, E. R., & Sweeney, H. L. (2012). Rescue of Dystrophic Skeletal Muscle by PGC-1 a Involves a Fast to Slow Fiber Type Shift in the mdx Mouse. *PLoS ONE*, 7(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030063>
- Siparsky, P., Kirkendall, D., & Garrett, W. (2014). Muscle Changes in Aging : Understanding. *Sports Health*, 6, 36–40.
<https://doi.org/10.1177/1941738113502296>
- Tabebordbar, M., Wang, E. T., & Wagers, A. J. (2013). Skeletal Muscle Degenerative Diseases and Strategies for Therapeutic Muscle Repair. *Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease*, 8, 441–475.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132450>

Talbot, J. (2017). Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Developmental Biology*, 5(4), 518–534.

<https://doi.org/10.1002/wdev.230>.Skeletal

Theilen, N. T., Kunkel, G. H., & Tyagi, S. C. (2018). The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. *J Cell Physiol.*, 232(9), 2348–2358. <https://doi.org/10.1002/jcp.25737>.The

Vinel, C., Lukjanenko, L., Batut, A., Deleruyelle, S., Pradère, J., Gonidec, S. Le, ... Dray, C. (2018). The exerkin apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nature Medicine*, 24, 1360–1371. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0131-6>