



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Evaluación del efecto del flavonol (-)-Epicatequina sobre los factores reguladores miogénicos y la hipertrofia de fibras musculares en cuádriceps de ratones CD-1

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO**

P R E S E N T A

ANDREA SAC-NITE TEJEDA GÓMEZ

ASESOR: Dr. Carlos Palma Flores

COASESORA: Q. Yesica Natali Álvarez Pacheco

Cuautitlán Izcalli, Edo. México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Evaluación del efecto del flavonol (-)-Epicatequina sobre los factores reguladores miogénicos y la hipertrofia de fibras musculares en cuádriceps de ratones CD-1.

Que presenta la pasante: **Andrea Sac-Nite Tejeda Gómez**
Con número de cuenta: **413101057** para obtener el título de: **Licenciada en Química.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de noviembre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Azucena Lee Mendoza	
VOCAL	Q. Karla Paola Hernández Pérez	
SECRETARIO	Q. Yesica Natali Álvarez Pacheco	
1er. SUPLENTE	L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	Dr. Samuel Álvarez Almazán	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/jvg



Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

H. Consejo Técnico

OFICIO: FESC/CT/ HRA/2587/05/2022
No. 13655

ASUNTO: Autorización de asesor externo.

p. L. Q. ANDREA SAC-NITE TEJADA GÓMEZ
DE CUENTA 413101057
PRESENTE

Informo a usted que el H. Consejo Técnico en la trigésima octava sesión ordinaria realizada el 25 de mayo de 2022, y con base en el artículo 107 del Reglamento para Titulación de la FES Cuautitlán, autorizó para que el Dr. Carlos Palma Flores, funja como asesor externo en su trabajo de tesis *"Evaluación del efecto del flavonol (-)-Epicatequina sobre la expresión de factores reguladores miogénicos y la hipertrofia de fibras musculares en cuádriceps de ratones CD-1"*, fungiendo como asesora interna la candidata a Dra. Yesica Natali Alvarez Pacheco.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. De Méx., mayo 26 de 2022.

EL SECRETARIO DEL H. CONSEJO TÉCNICO

DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

C.c.p. Coordinación de Química
Unidad de Administración Escolar
Departamento de Titulación
Expediente
Minuta

H. CONSEJO TÉCNICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
CUAUTITLÁN - U.N.A.M.**

HRA/JFSR/aarg

DEDICATORIA

El resultado de este trabajo lo dedico a la memoria de mi madrina Maria Cristina Gómez Garcia quien marco mi camino con su partida, gracias a ella decidí dedicarme al área biológica a pesar de no contar con el conocimiento necesario; planteándome retos nuevos para aprender conocimientos y metodologías más avanzados del nivel de licenciatura con el objetivo de aportar un pequeño peldaño al área de la salud.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis es gracias al apoyo incondicional de mis padres Alejandra Gómez y Jorge Tejeda, los cuales me brindaron siempre las herramientas necesarias en cada paso que daba, a mi hermano Rodrigo Tejeda que me alegró el camino con su peculiar sentido del humor.

Agradezco a mis abuelos Efraín Tejeda, Modesta Razo, Rebeca García e Ignacio Gómez, los cuales fueron después de mis padres lo que más se preocupaban por mí y me aconsejaban en decisiones vitales para mi formación personal y profesional. A mis tíos Nancy, Gerardo, Leticia, Emilia, Ignacio, Juan José y Leticia Ramírez, a quienes agradezco el ejemplo de superarse profesionalmente y personalmente; así como por darme el apoyo económico cuando lo necesite con el objetivo de culminar mis estudios profesionales; los quiero y admiro muchísimo.

Agradezco a mi esposo Didier por trasnochar conmigo y aguantar mis momentos de inseguridad, estrés y ansiedad gran parte de la carrera, hasta el culminó de este trabajo escrito, a mis amigos que aportaron en gran medida el crecimiento profesional hasta el momento alcanzado.

Este trabajo no pudo realizarse sin el apoyo de mi tutor externo el Dr. Carlos Palma Flores que siempre estuvo guiando y aportando parte de su conocimiento para mi formación académica con paciencia y sabiduría, así como mis compañeras de laboratorio Mirna, Andrea, Yali, Ariadna, Itzel, Diana y principalmente Magally y Alexa quienes complementaron mi conocimiento en técnicas en las que dominaban.

Agradezco mi tutora interna Yesica Álvarez y mis sinodales el apoyo y las correcciones realizadas, les estaré agradecida eternamente.

Finalmente, y no menos importante agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por el apoyo y enseñanza que en sus aulas cada docente aportó a mi vida profesional.

“Este no es el final, si no el inicio de una nueva aventura”

Cuautitlán Izcalli, Edo. México, 2022

RECONOCIMIENTO

Se reconoce y agradece el apoyo otorgado por la Coordinación de Investigación del Centro Nacional 20 de Noviembre.

Se agradece al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez por el apoyo a través de CONACYT en el Sistema Nacional de Investigadores por la beca otorgada como ayudante de investigación, bajo el convenio SIN 11369

Se agradece a la Dra Anya Ayelen Valdez Hernandez por su participación y la presentación de este trabajo de tesis en el XVII Foro PIFI 2022 de la Escuela superior de medicina del IPN

Se reconoce al Dr. Carlos Palma Flores, Paola B. Zárate Segura, José Manuel Hernández Hernández, Dr. Sergio de los Santos, Dr. Luis Javier Cano Martínez, Dra. Patricia Canto, Jorge Omar Garcia Rebollar y al Dr. Ramón M. Coral Vázquez por incluir este trabajo de tesis en el artículo *(-)-Epicatechin modulates the expression of myomiRs implicated in exercise response in mouse skeletal muscle.*

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Aspectos generales	5
2.2. Estructura y función del músculo esquelético	6
2.3. Formación, desarrollo y reparación	8
2.3.1. Miogénesis embrionaria (formación y desarrollo).	9
2.3.2. Mecanismos de la miogénesis posnatal.	10
2.4. Importancia de los factores reguladores miogénicos (MRF)	11
2.5. Patologías del músculo esquelético	14
2.6. Efectos de la actividad física en el músculo.	16
2.7. La (-)-epicatequina como un coadyuvante terapéutico alternativo	17
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVO	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos particulares	22
5. HIPÓTESIS	22
6. DIARAMA METODOLÓGICO	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS	24
7.1. Experimento con ratones CD-1	24
7.2. Histología	26
7.3. Extracto total de proteína de tejido	26
7.4. Cuantificación de extracto total de proteína (ETP)	27
7.5. Integridad del extracto total de proteína	28
7.6. Western blot	29

7.6.1.	Electroforesis	29
7.6.2.	Transferencia	30
7.6.3.	Western blot.....	30
7.7.	Análisis estadístico	30
8.	RESULTADOS.....	31
8.1.	Estandarización de la tinción hematoxilina y eosina (H&E).	31
8.2.	Análisis de la tinción H&E	32
8.3.	Estandarización western blot.....	34
8.3.1.	Cuantificación del ETP.....	34
8.3.2.	Integridad del ETP.....	36
8.3.3.	Estandarización de la inmunotransferencia	37
8.3.4.	Estandarización del western blot	39
8.4.	Análisis de la expresión de MyoG y MyoD.....	40
9.	DISCUSIÓN.....	42
10.	CONCLUSIONES.....	43
11.	REFERENCIAS	44
12.	APENDICE Abreviaturas y siglas.....	50
12.1.	INDICE.	51
13.	APÉNDICE I	52

1. INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético (ME) conforma aproximadamente la mitad de la masa corporal total, está involucrado en la locomoción, fuerza y en el metabolismo del cuerpo, está constituido por células que reciben el nombre de miofibras musculares, las cuales son el resultado de la fusión de mioblastos mononucleados. (Luo *et al.*, 2015) En respuesta al daño, el ME activa diferentes procesos que permiten su regeneración.

En patologías asociadas al ME, los procesos y mecanismos moleculares que conducen a la regeneración del tejido se ven ampliamente afectados (Rochlin *et al.*, 2010). Actualmente, no existe un tratamiento que contrarreste el proceso degenerativo; por tal motivo, se ha propuesto el uso de fitofármacos como una alternativa. Muchas de estas moléculas han demostrado tener efectos regenerativos, lo cual impide la pérdida de tejido. De esta forma se busca proponer alternativas terapéuticas coadyuvantes como lo es el caso del flavonol (-)-epicatequina, el cual es un fitofármaco que ha mostrado tener efectos benéficos en el músculo esquelético que podría tener un potencial beneficio en algunas patologías como lo son la distrofia muscular de Duchenne (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2014).

Entre los procesos celulares que se analizan para determinar si el uso de fitofármacos promueve un aumento en el potencial regenerativo, es el proceso de diferenciación celular; proceso mediante el cual una célula adquiere características morfológicas y las funciones del grupo celular específico y diferente al resto de los grupos celulares. La diferenciación celular en las células musculares consiste en la fusión entre mioblasto (si es una diferenciación por daño muscular, es una fusión entre mioblastos y miofibras). Para estudiar dicho proceso, se emplean sistemas *in vivo* e *in vitro*.

En el laboratorio, el análisis *in vitro* se realiza utilizando células C2C12, las cuales son un tipo de células musculares que permiten simular las condiciones basales de la formación de miofibras musculares a partir de la fusión de mioblastos mononucleados. Por otro lado, en modelos *in vivo*, se utilizan ratones genéticamente modificados y silvestres con los cuales se pueden simular patologías y evaluar potenciales tratamientos químicos. (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2014)

En este trabajo, se buscó determinar el efecto del flavonol (-)-epicatequina sobre las fibras musculares en cuádriceps de ratones CD-1 sanos; con el objetivo de favorecer la expresión de los factores reguladores miogénicos y la hipertrofia, a través de 2 vías. La primera es de manera analítica, la cual se puede cuantificar por medio de la expresión de los factores reguladores en el proceso de diferenciación y crecimiento de miofibras musculares, mediante ensayos de western blot (WB). Los ensayos de WB permiten visualizar la cantidad de proteína de una muestra presente en el tejido o el cultivo celular bajo una condición determinada. Esto permite determinar si bajo una condición particular existe un aumento o decremento en la cantidad de un factor importante en la diferenciación o crecimiento celular.

Adicionalmente, para evidenciar si estos cambios a nivel molecular se relacionan con cambios favorables en la morfología de las fibras musculares, estos ensayos se complementan con estudios histológicos que permite determinar si el uso del fitofármaco favorece la hipertrofia a partir de la comparación del área de la miofibra tratada con su control. Esto genera información, la cual puede demostrar si un fitofármaco puede ser empleado o no como un posible coadyuvante terapéutico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos generales

El movimiento del cuerpo resulta de la contracción y relajación alterna de los músculos, los cuales están representados en 650 músculos, lo que corresponde al 40% del peso corporal de un varón adulto. Aproximadamente el 30% del músculo corresponde al músculo esquelético y el otro 10% al músculo liso.

El tejido muscular se define como un órgano blando compuesto principalmente por células que reciben el nombre de fibras musculares y por tejido conectivo que rodea tanto a las fibras musculares como al músculo entero. Las fibras musculares utilizan ATP para transformar una parte en trabajo mecánico, pero la mayor parte se disipa en forma de calor para el mantenimiento de la temperatura corporal.

Posee cuatro propiedades particulares, las cuales permiten el buen funcionamiento y contribuyen a la homeostasis. Una de las propiedades es la capacidad de responder a ciertos estímulos produciendo señales eléctricas llamadas *potenciales de acción*; estos a su vez estimulan energéticamente el tejido muscular provocando que este se *contraiga*. La *extensibilidad* es la capacidad del tejido muscular de estirarse sin dañarse, permitiendo al músculo contraerse con fuerza incluso estando elongado, finalmente la cuarta propiedad es que el músculo tiene *elasticidad* debido a que vuelve a su longitud y forma original tras la contracción o extensión (Hall, 2020).

El tejido muscular se clasifica según su control, ya sea voluntario o involuntario; y por su estructura y aspecto microscópico (estriado o liso); el tejido muscular liso es aquel que no tiene estriaciones transversales; mientras que el estriado tiene estriaciones transversales visibles al microscopio (Hall, 2020).

El tejido muscular estriado (*Figura 1*), se inserta en los huesos, el glóbulo ocular, la lengua y el miocardio. El músculo estriado del miocardio es denominado músculo cardíaco y a los otros se les da el nombre de músculo esquelético; el tejido muscular estriado esquelético tiene a su cargo 2 funciones, el primero es el movimiento de los esqueletos axial y apendicular y el segundo es el mantenimiento de la postura o posición corporal (Kochi et al., 2013).

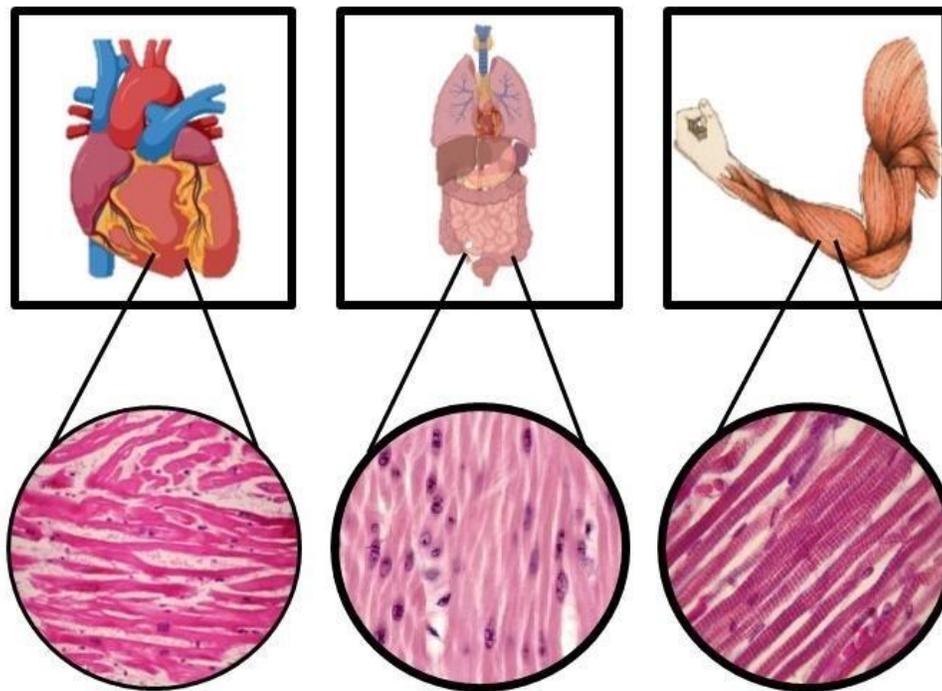


Figura 1. Clasificación del músculo según su localización, control y aspecto. El aspecto histológico clasifica al músculo en liso y estriado. Su localización en visceral, cardíaco y esquelético; y su control en voluntario e involuntario (Kochi et al., 2013).

2.2. Estructura y función del músculo esquelético

El músculo esquelético está compuesto por tejido conectivo que adhiere al músculo esquelético a otras estructuras y constituyen el soporte de los vasos sanguíneos y nervios necesarios para el mantenimiento del músculo, también es esencial para la transmisión de la fuerza generada por las células musculares al esqueleto, además de rodear y proteger al tejido muscular con tres capas; la capa más externa es la encargada de envolver al músculo en su totalidad por una banda de tejido denso e irregular con abundantes fibras de colágeno y fibras elásticas denominado epimisio. La segunda capa denominada perimisio rodea grupos de entre 10 a más de 100 fibras musculares agrupándolas en haces o fascículos. En el interior de cada fascículo se encuentra la tercera capa que separa las fibras musculares una de otras por una fina lamina de tejido conectivo areolar; esta lamina se denomina endomisio. El tejido conectivo proporciona una adecuada cohesión tanto a los fascículos como a las fibras musculares integrando sus movimientos (Tortora and Derrickson, 2021).

Las células del músculo esquelético son fibras largas y multinucleadas que se extienden a lo largo longitudinal del músculo, cuyo diámetro varía entre 10 a 100 μm , dependiendo el sexo, la edad, el ejercicio, el estado nutricional y la posición de cada fibra dentro del músculo. Casi todas las fibras están inervadas por una sola terminación nerviosa localizada cerca del punto medio de la fibra. La membrana celular de las fibras musculares está formada por una capa delgada que contiene múltiples fibrillas delgadas de colágeno denominada sarcolema. Miles de pequeños plegamientos del sarcolema llamadas túbulos T y el retículo sarcoplásmico, son estructuras muy importantes en la transmisión de la despolarización eléctrica de la superficie de la célula, para abrir canales en la membrana celular, permitiendo que grandes cantidades de iones de calcio se liberen, provocando la contracción muscular (*Sengupta et al., 2010*).

Dentro del sarcolema, se encuentra el citoplasma de la fibra, el cual recibe el nombre de sarcoplasma, el cual posee una cantidad sustancial de glucógeno y la proteína mioglobina, que sirve para la síntesis de ATP, debido a su función el sarcoplasma se extiende estratégicamente en la fibra cerca de las proteínas que utilizan ATP durante la contracción.

Cada fibra muscular está compuesta por miles de miofibrillas denominadas filamentos (*Figura 2*), organizadas en compartimientos llamados sarcómeros; existen dos tipos de filamentos, los filamentos finos que están compuestos por aproximadamente 3000 filamentos de actina y 1500 filamentos de miosina adyacentes entre sí, estas proteínas polimerizadas son responsables de la contracción muscular. Por otro lado, los núcleos de las fibras musculares son ovalados y se encuentran periféricamente alineados bajo el sarcolema; esta característica hace que los mononúcleos pierdan su capacidad de mitosis. Si los núcleos ocupan la parte central de la fibra, nos da referencia a un proceso de reparación (*J, n.d.*).

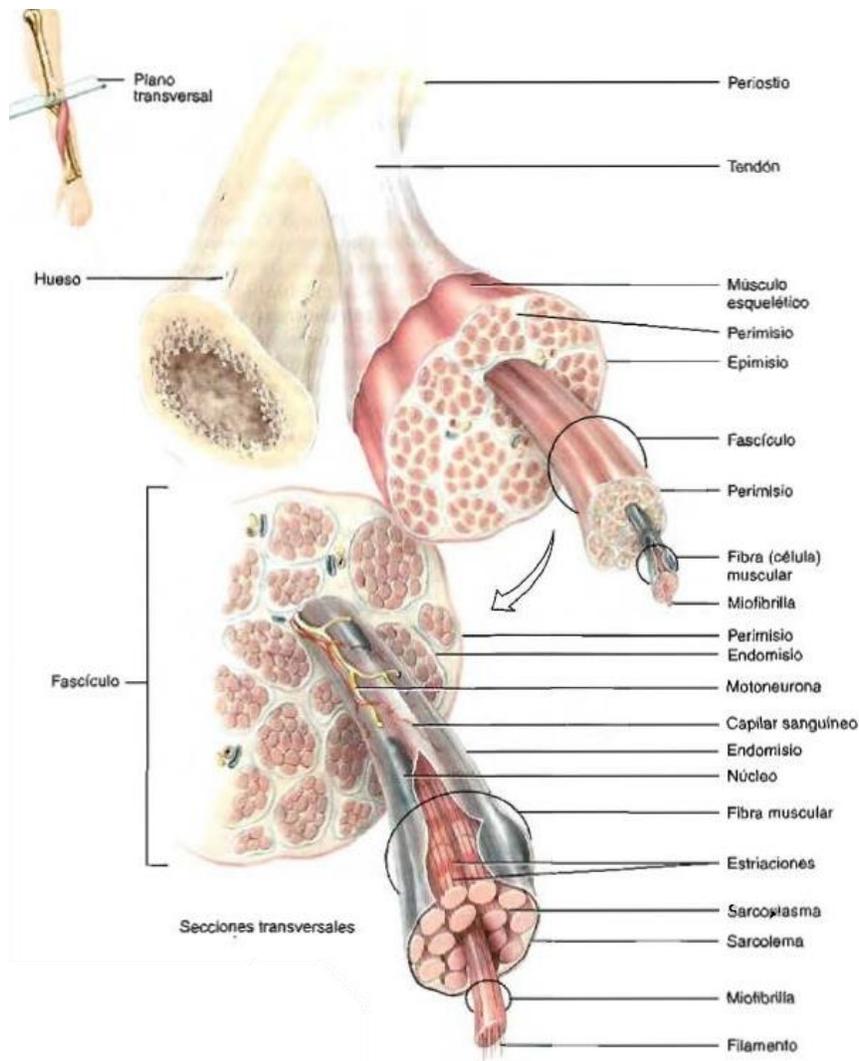


Figura 2. Organización del músculo esquelético y sus envolturas de tejido conectivo. El músculo esquelético consiste en fibras (células) musculares individuales agrupadas en fascículos y rodeadas por tres capas de tejido conectivo, extensiones de la fascia profunda (J, n.d.).

2.3. Formación, desarrollo y reparación

El músculo se desarrolla al inicio para su formación durante la gestación embrionaria, llevando a cabo un proceso de miogénesis embrionaria; mientras que, en etapa adulta, cuando el músculo ya se encuentra formado, requiere de un proceso regenerativo ya sea para mantener el músculo o repararlo por algún daño (Almada and Wagers, 2016; Puri et al., 1997).

El desarrollo de las miofibras en etapa embrionaria como en etapa adulta es llevado por un proceso complejo a través factores reguladores miogénicos (MRFs), que actúan en diferentes

puntos del ciclo celular, activando y regulando la proliferación y diferenciación celular a partir de células madres en estado quiescente llamadas células satélite. Estos procesos que se llevan a cabo en la formación del tejido se describen a nivel molecular en los párrafos siguientes.

2.3.1. Miogénesis embrionaria (formación y desarrollo).

Durante el desarrollo embrionario se inicia la formación del músculo esquelético en el somita; los cuales se diferencian rápidamente y migran por debajo de los dermomiomas, para formar miotomas, los cuales adquieren el fenotipo de mioblastos; células con la capacidad de proliferar y de diferenciarse, abandonando el ciclo celular al fusionarse y formar miofibras (Jiménez Hernández, 2018; Jin et al., 2016).

Se ha demostrado que para la formación y desarrollo del músculo se requiere de marcadores moleculares pared box (Pax 3 y Pax 7) pertenecientes a la familia Pax; los cuales tiene un papel muy importante en la migración de la somita, la proliferación y la diferenciación celular (Jin et al., 2016).

Cuando Pax 3 disminuye gradualmente la familia de MRF aumenta significativamente; el gen Factor Regulador Miogénico 5 (Myf5) tiene la función de formar la estructura muscular que contienen las células ya comprometidas, Miogenina número 1 (MyoD) se activa a la par de Myf5 para iniciar la programación de miogénica de la célula. Miogenina (MyoG) es un gen clave para activar la programación de la diferenciación muscular (Jin et al., 2016; Luo et al., 2015).

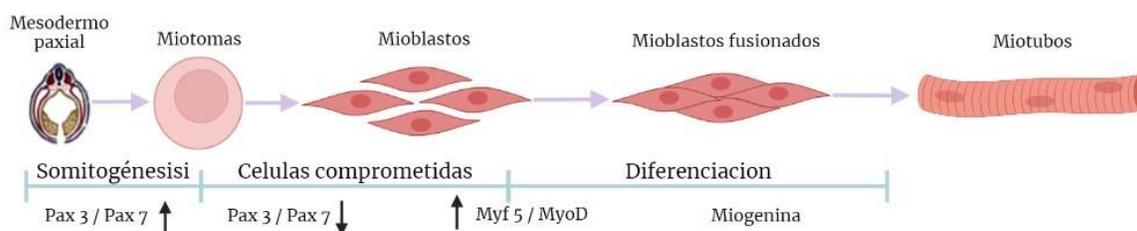


Figura 3 Representación esquemática de miogénesis embrionaria.

En la **figura 3** se puede observar el proceso molecular que describe la acción de señales positivas y negativas que controla la expresión espacio-temporal de los genes musculares; así como, las redes reguladoras de genes realizadas por factores transcripcionales miogénicos, dando culminación a la formación de miofibras.

Las primeras fibras musculares que aparecen se conocen como fibras primarias, las cuales tienden a convertirse en fibras lentas. Posteriormente, otras señales estimulan una ola de proliferación dando lugar a una población de los denominados mioblastos secundarios que se diferenciarán para formar fibras secundarias, las cuales adquieren las características de las fibras rápidas. Una vez formadas experimentan un crecimiento muy extenso en el período fetal y posnatal (*Buckingham et al., 2003; Jin et al., 2016*)². (“ASPECTOS BASICOS DE LA MIOGENESIS.pdf,” n.d.).

2.3.2. Mecanismos de la miogénesis posnatal.

En la edad adulta; el músculo esquelético está sujeto a una regeneración continua; debido a que se encuentra en un estado dinámico con un recambio continuo debido especialmente a traumas diarias y pequeñas lesiones, así como también lesiones ocasionadas después de alguna lesión por un entrenamiento físico excesivo; esta regeneración continua está mediada por las *células satélite (MuSC)*, células en etapa G₀ o quiescente que se ubican entre la lámina basal y el sarcolema (*Yin et al., 2013*). La función inicial de estas es, proliferar como células mioblásticas y diferenciarse para formar nuevas fibras musculares y/o volver a la inactividad para mantener el conjunto de células madre (*Jin et al., 2016*). A este ciclo celular y reparación del daño, se le conoce como Miogénesis Muscular (*Holtzer et al., 1957*).

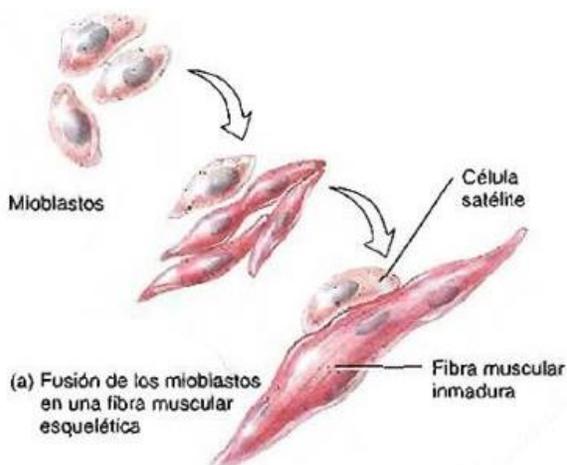


Figura 4 Fusión de mioblastos en una fibra muscular esquelética.

La miogénesis muscular inicia con la activación de las MuSC en respuesta a la lesión, las cuales expresan un factor de transcripción nuclear Pax 7 de forma propagada en las células inactivas y se coexpresa con el gen Myf5, lo que da las señales correspondientes para salir de la quiescencia; seguido de éste encendido, se expresa MyoD para activar el proceso de

diferenciación provocando la disminución de la expresión de Pax 7. (Gerber et al., 1997) Este cambio de expresiones orquestará la diferenciación de los mioblastos alineándose entre ellos para pasar a la siguiente etapa de fusión. La expresión de MyoG es inducida por MyoD lo que resulta en la inhibición de la expresión de Myf5; otro marcador que compromete a la célula a la diferenciación (Jin et al., 2016; Relaix et al., 2006).

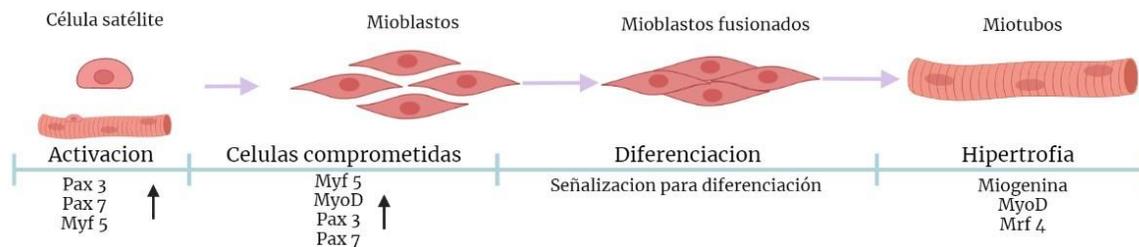


Figura 5 Representación esquemática de la regeneración muscular adulta. Las células satélite inactivas se activan y se dividen asimétricamente, generando una célula que se autorrenueva y un progenitor comprometido que comienza a expresar Myf5; A continuación, una vez activadas expresan MyoD y regulan a la baja Pax7. Finalmente, las células se diferenciarán y fusionarán para formar nuevas miofibras durante la regeneración del músculo adulto.

Como ya se vio la miogénesis esta estrictamente regulada por la expresión secuencial y coordinada de una gran familia de marcadores reguladores miogénicos necesarios para el compromiso inicial de la regeneración del músculo. Lo que nos indica que estos mecanismos pueden promover o suprimir la velocidad y la cantidad de células que participarán en la generación de una fibra; de esta manera sirven como marcadores para distinguir el estadio en el que se encuentra la célula muscular (Huang et al., 2016; Relaix et al., 2006).

2.4. Importancia de los factores reguladores miogénicos (MRF)

La expresión génica del músculo esquelético está controlada por un grupo complejo de reguladores que se derivan de una de las dos familias principales de factores de transcripción; los factores reguladores miogénicos (MRF) son miembros de la familia básica de hélice-bucle-hélice (bHLH), que les confiere la capacidad de reconocer la secuencia E-box (CANNTG) en las secuencias reguladoras de los genes diana tras la heterodimerización con un miembro de la ubicuidad familia de proteínas E expresadas de proteínas bHLH; forman el núcleo de la red transcripcional que conduce al desarrollo del músculo esquelético a través de la unión directa al ADN. Están formados por cuatro proteínas clase II, debido a que su expresión está restringida a un solo tipo de tejido (músculo esquelético); los cuales incluyen

MyoD, Myf5, Myogenin y Myogenic Regulatory Factor 4 (MRF4), estos se expresan de forma restringida en células progenitoras miogénicas derivadas de somitas, sus mioblastos derivados y las células satélite (Asfour et al., 2018; Hernández-Hernández et al., 2017).

Estructuralmente cada proteína de los MRF varía según su tamaño, sin embargo comparten 3 dominios estructurales de aminoácidos. El primero es un bHLH, el segundo es un dominio de cisteína/histidina que se encuentra en el lado N-terminal (Hollenberg et al., 1993). El tercero es un dominio rico en serina/treonina, ubicado cerca del carboxilo terminal del dominio bHLH.

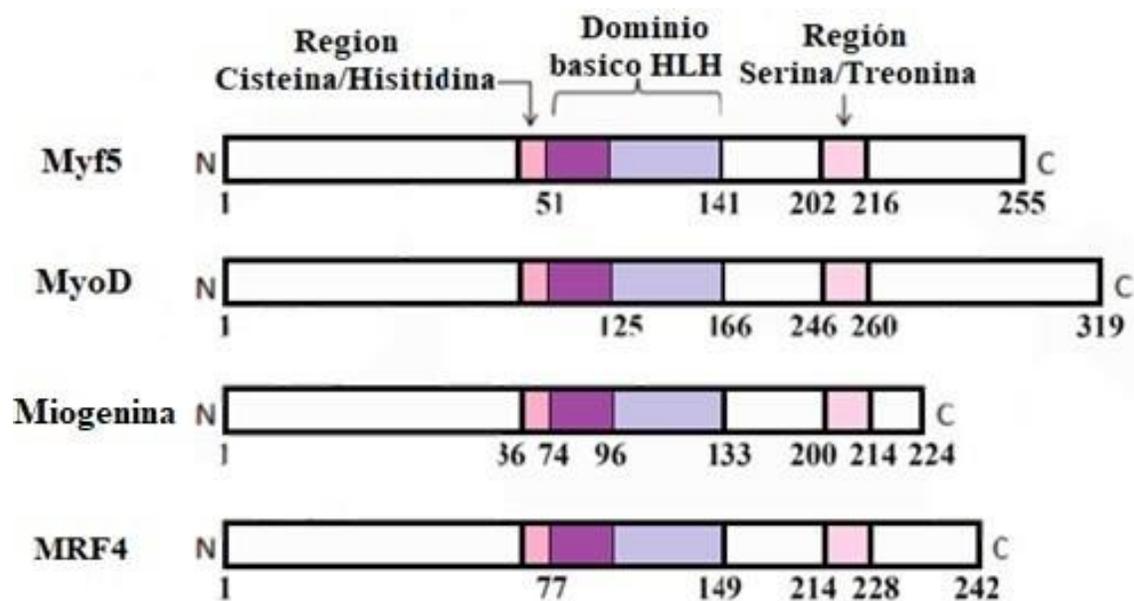


Figura 6 Estructuras primarias de los MRF. Se muestran las tres regiones que comparten entre ellas; así como el número de aminoácidos representados debajo de cada estructura (Hollenberg et al., 1993).

Los MRF son actores clave en el proceso de miogénesis, estos factores funcionan como una cascada orquestadora, con algunas acciones superpuestas. Codifican factores de transcripción específicos y son esenciales para la activación transcripcional de muchos músculos. Se ha comprobado que cuando se completa la diferenciación muscular los MRF continúan expresándose a niveles muy bajos (Asfour et al., 2018; Kim et al., 2008).

La expresión a niveles altos de los MRF pueden regularse en músculos adultos después de cambios de activación por lesiones que son realizadas por activación eléctrica o eliminación completa en la entrada sináptica neuronal (de la Serna et al., 2005).

La acción colectiva de los MRF parece altamente concertada y acumulativa donde algunos factores pueden inducir a otros, mientras que otros pueden regular aún más su propio nivel de expresión. Un ejemplo de esto es MyoD y Myogenina, los cuales tienen un mecanismo de autorregulación; sin embargo con MRF4 no funciona igual, ya que se ha demostrado que puede ser transactivada por los demás MRF, pero no tienen una función de autoactivación, para mejorar su nivel de expresión (*Asfour et al., 2018*).

Estos MRF son de suma importancia para poder analizar el proceso de regeneración muscular; en este trabajo se busca medir Miogenina número 1 (MyoD) y Miogenina (MyoG), debido a que tienen objetivos superpuestos y se unen a secuencias de ADN E-box muy similares, por lo tanto, regulan directamente la expresión de muchos de los genes musculares; se ha demostrado que MyoD1 y MyoG parecen tener funciones distintivas que se producen de forma secuencial en los promotores individuales. (*Adhikari et al., 2021; Venuti et al., 1995*) En estudios anteriores se ha demostrado que los ratones que carecen de MyoG mueren al nacer debido a una reducción severa del músculo esquelético y MyoD todavía se expresaba en estos; sin embargo, no podía compensar la falta de MyoG (*Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993*).

MyoD es un gen regulador maestro para la miogénesis, es considerado de esta manera debido a que ocupa la parte superior de la jerarquía reguladora para inducir la diferenciación del músculo esquelético en fibroblastos y otras células musculares no esqueléticas; (*Kin Chan, 2013; Wardle, 2019*) es decir que, funge como activador de la expresión de otros reguladores musculares que funcionan en combinación para inducir la diferenciación del músculo esquelético (*de la Serna et al., 2005; Olson, 1990*).

Como ya se mencionó MyoG es el único MRF esencial para la vida, es encargado de ensamblar la maquinaria de transcripción y actúa también para regular la diferenciación terminal de mioblastos, la maduración de miofibras y el tamaño de la fibra; se ha demostrado que es necesario para la expresión de proteínas de membrana implicadas en la fusión celular como la activación de Myomaker, una proteína encargada de la fusión de mioblastos, dependiente totalmente de la MyoG (*Ganassi et al., 2018; Luo et al., 2015*).

2.5. Patologías del músculo esquelético

El proceso de la pérdida y/o desgaste muscular son síntomas clínicos asociados a uno de estos cuatro procesos: miopáticos (procesos que desgastan la función y fuerza del músculo), patológicos (enfermedades metabólicas, desnutrición, sedentarismo, diabetes, cáncer, enfermedades reumáticas, obesidad, etc), fisiológicos (ocasionados por el envejecimiento) y genéticos (distrofias musculares con curso progresivo) (*Campo et al., 2016; Pedersen and Febbraio, 2012*).

El envejecimiento disminuye la masa del músculo esquelético, lo que produce debilidad muscular y limitaciones funcionales; a este proceso se le conoce como sarcopenia; la pérdida de la función muscular se ve acompañada y asociada a un aumento en la dependencia y elevación de la mortalidad por la edad; cuando uno envejece se promueven estados de inflamación, obesidad y resistencia a la insulina, con su consecuente pérdida de la masa muscular, por este motivo se considera a la sarcopenia como la principal causa de discapacidad entre los adultos mayores (*Campo et al., 2016; Forbes et al., 2012*).

La sarcopenia involucra, atrofia progresiva del tejido muscular y reemplaza al músculo por tejido graso y conectivo; lo que provoca el incremento de riesgos de caídas y fracturas al reducir la densidad mineral ósea. También se asocia al desarrollo de enfermedades metabólicas al promover cambios corporales que favorecen la acumulación adiposa; ya que el músculo es el mayor tejido que participa en el metabolismo de la glucosa, por lo tanto, afecta los estados de glicemia en el organismo, incrementando la resistencia a la insulina y el desarrollo de diabetes tipo 2 (DM2); es por esto que se vuelve en un gran reto para los sistemas de salud, debido a que no existen terapias efectivas, ni tratamientos farmacológicos aprobados para prevenir o revertir la sarcopenia asociada con la edad (*Camporez et al., 2016*).

En el músculo sano, la reparación suele ser un proceso notablemente eficiente. Sin embargo, es probable que la función de las células satélite se vea comprometida en las distrofias musculares, las cuales son un conjunto de trastornos hereditarios en los que hay una pérdida de la estructura y función muscular, lo que provoca debilidad y discapacidad (*Boldrin et al., 2015; Jiménez Hernández, 2018*).

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de patologías de origen monogénico, cuyos patrones de afectación muscular son mayormente por el gen responsable y la proteína afectada. La distrofia más grave de todas, es la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) la cual se caracteriza por la atrofia muscular esquelética progresiva y debilidad que conduce a la pérdida de la deambulación y muerte prematura por insuficiencia respiratoria y cardíaca; la mutación del gen DMD codifica la proteína Distrofina, una proteína perteneciente al Complejo Distrofina-Glicoproteínas cuya función es brindar al músculo resistencia mecánica durante la contracción de las fibras (*Jiménez Hernández, 2018; St. Andre et al., 2017*).

La reparación eficiente de las fibras musculares dañadas en las patologías mencionadas requiere de la arquitectura del nicho celular, de las células satélites residentes del nicho ya que juegan un papel importante en la organización y especificación en las condiciones de este y de otras células no musculares que intervienen en el proceso de regeneración (*Ceafalan et al., 2018; Henríquez-Olguín et al., 2019*).

Como ya se ha revisado la regeneración en el músculo esquelético adulto se basa en la activación, proliferación y fusión de células satélite, después de que los restos de la fibra dañada son removidos por células inflamatorias. Sin embargo, en una distrofia muscular, las fibras sufren degeneración constante por tener un defecto molecular subyacente; por lo que, el ciclo persistente de inflamación y regeneración, lo que conlleva al reemplazo progresivo del tejido muscular por tejido distinto. Paulatinamente el tejido muscular va reduciendo la función de las fibras contráctiles y su número. Al igual que con la sarcopenia no existe un tratamiento clínico efectivo que pueda combatir o atenuar la fibrosis en pacientes con distrofia (*Tidball et al., 2021*).

Existen muchas otras patologías que también están asociadas con la pérdida de masa muscular, como lo son las enfermedades reumáticas, de las cuales podemos resaltar la Artritis Reumatoide, el Lupus Eritematoso Sistémico y la Espondilitis Anquilosante. El mecanismo por el que estas enfermedades conduce a la pérdida de masa muscular es conocido como caquexia reumatoidea; este proceso involucra la participación de múltiples tejidos, vías y moléculas que conducen a estados crónicos inflamatorios y subsecuentemente a la sarcopenia. Inicialmente la pérdida de masa muscular es debido a la imposibilidad de realizar actividad física, lo que conlleva a la acumulación de grasa visceral y finalmente cierra el

círculo de la inflamación del sistémica al exacerbar la inflamación (*Benatti and Pedersen, 2015*).

2.6. Efectos de la actividad física en el músculo.

La actividad física regular, es la clave en la prevención, control y el tratamiento de numerosas afecciones crónicas, como la hipertensión, la enfermedad coronaria, la obesidad, DM2 y la atrofia muscular relacionada con la edad, debido a que involucra la integración, activación y sincronización de múltiples tejidos y órganos al nivel sistemático y celular; además de que contribuye a la recuperación de la masa y fuerza muscular.

El músculo emite señales al sistema cardiovascular, respiratorio, nervioso y metabólico, que permiten responder a las demandas metabólicas; con el tiempo, el músculo esquelético demuestra una notable maleabilidad en la adaptación funcional y la remodelación en respuesta a la actividad contráctil, estas adaptaciones inducidas por el entrenamiento se reflejan en cambios en la proteína y la función contráctiles, en la función mitocondrial, en la regulación metabólica, en la señalización intracelular y en las respuestas transcripcionales (*Egan and Zierath, 2013*).

El músculo esquelético es el principal contribuyente a los cambios en el metabolismo inducidos por el ejercicio, debido a que modula rápidamente la tasa de producción de energía, el flujo sanguíneo y la utilización de sustratos en respuesta a la locomoción impulsada por el ciclo del puente cruzado de actina-miosina de acuerdo con la teoría del filamento deslizante de la contracción del músculo esquelético (*Gaitanos et al., 1993*).

El ejercicio está representado por una interrupción potencial de la homeostasis por la actividad muscular incluyendo la frecuencia, intensidad y duración de las sesiones de ejercicio, cada uno de los cuales son factores atenuantes que afectan las respuestas metabólicas y moleculares. Las actividades aeróbicas (basadas en la resistencia por repetición continua) aumenta la capacidad respiratoria y el volumen mitocondrial en el músculo; mientras que el ejercicio anaeróbico (basadas en la fuerza por ejercicio pausado) o de resistencia, induce hipertrofia y aumento en la fuerza contráctil (*Hawley et al., 2014; Steffl et al., 2017*).

Histológicamente, el músculo esquelético parece uniforme pero está compuesto por miofibras heterogéneas en cuanto a tamaño, metabolismo y función contráctil; tiene dos tipos principales de fibras, las fibras tipo I (lentas) tienen un metabolismo oxidativo, y poseen una apariencia rojiza y las fibras tipo II (rápidas) tienen un metabolismo oxidativo, glucolítico y tienen una apariencia blanquecina. (*Saltin et al., 1977*) El ejercicio aeróbico aumenta la cantidad de fibras tipo I, aumentando niveles de enzimas oxidativas, glicógeno y transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4), lo que aumenta la sensibilidad a la insulina y mejora la homeostasis de la glucosa corporal. Sin embargo, con la inactividad física, existe mayor conversión de las fibras al tipo II, haciéndolas menos capaces de sustentar ejercicios aeróbicos, contribuyendo a estados de resistencia a la insulina (*Goodyear, 2008; Jiménez Hernández, 2018*).

Los efectos del entrenamiento de fuerza en las personas con un historial de entrenamiento previo incluso después de una inactividad posterior prolongada adquieren fuerza rápidamente al volver a entrenar, facilitando el reentrenamiento; a este fenómeno comúnmente observado se ha denominado "memoria muscular", atribuido a que las fibras que habían sido hipertróficas conducen a un número elevado y duradero de mionúcleos, los que podrían servir como sustrato biológico celular para provocar que se genere masa más rápido que aquellas fibras que no habían tenido esta característica (*Bruusgaard et al., 2010; Kadi et al., 2004*).

Los MRF son factores de transcripción que promueven y regulan la expresión de genes específicos del músculo, esenciales para la respuesta hipertrófica y regenerativa después del ejercicio de resistencia; diversos estudios han demostrado que la expresión de MyoD y MyoG aumenta después del ejercicio; indicando hipertrofia sustancial en las fibras musculares durante un entrenamiento físico más prolongado (*Fritzen et al., 2020; Snijders et al., 2014*).

2.7. La (-)-epicatequina como un coadyuvante terapéutico alterno

Aunque el ejercicio sigue siendo la intervención más efectiva en la prevención, control y el tratamiento de numerosas afecciones crónicas, en condiciones como las distrofias musculares, la caquexia y la sarcopenia; la pérdida muscular es avanzada y la realización de la actividad física resulta difícil o hasta imposible como alternativa terapéutica. Actualmente no existe un tratamiento farmacológico que contrarreste el proceso degenerativo.

Los flavonoides son una clase de compuestos naturales reconocidos por sus beneficios para la salud, atribuidos a su potencial antioxidante “directo”. Sin embargo, para los flavonoides con actividad antioxidante similar, los efectos biológicos finales varían ampliamente (*Ramirez-Sanchez et al., 2013*). Por esta razón la importancia de estudiar los procesos musculares bajo el efecto del flavonol (-)-Epicatequina (el flavonol más abundante que se encuentra en el cacao), el cual ha demostrado ser un fitofármaco que promueve la mejora del músculo esquelético durante un proceso regenerativo como lo es en el caso de la distrofia muscular (DM) (*Ramirez-Sanchez et al., 2014*).

El nombre IUPAC de la (-)-epicatequina es (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-1-benzopiran-3,5,7-triol (**Figura 7 A**); pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como catequinas, debido a que contiene un fragmento de catequina en 3,4-dihidro-2-cromeno-3,5,7-tiol (**Figura 7 B**), la cual cumple con la estructura química C₆-C₃-C₆ (**Figura 7 C**).

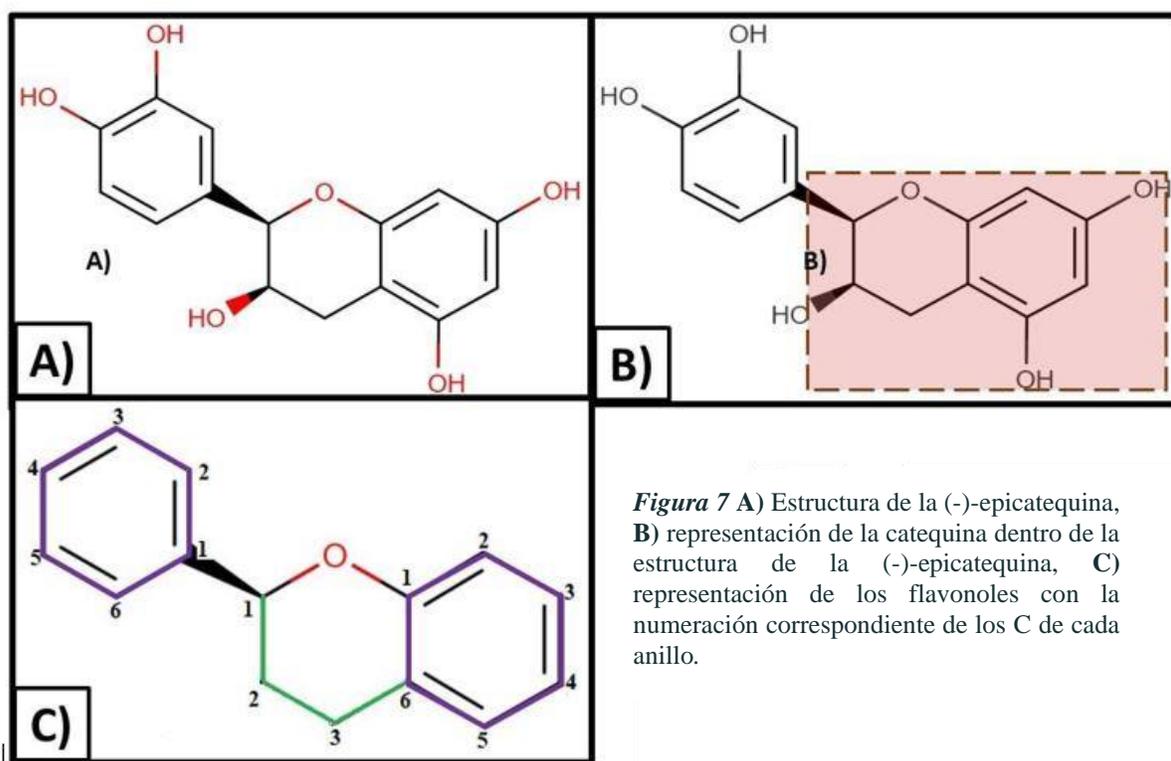


Figura 7 A) Estructura de la (-)-epicatequina, **B)** representación de la catequina dentro de la estructura de la (-)-epicatequina, **C)** representación de los flavonoles con la numeración correspondiente de los C de cada anillo.

La (-)-epicatequina se encuentra en diversos alimentos como las uvas, el té verde, la caña de azúcar, la manzana, los frutos de los espinos, en variedades de arbustos, en el cacao y el chocolate; en estos últimos en mayor cantidad (*Miller et al., 2009*). Casi el 10% del peso del

polvo de cocoa corresponde a polifenoles totales, por tal motivo la (-)-epicatequina es uno de los enfoques terapéuticos para distintas enfermedades musculares más prometedor, pues ha demostrado incrementar la masa muscular promoviendo su regeneración; en nuestro grupo de trabajo se utiliza un ratón deficiente de un gen muscular que promueve el desarrollo de distrofia muscular y una cardiopatía dilatada llamado δ -salcoglicano (δ -KO), con el cual se ha demostrado que (-)-epicatequina disminuye la fibrosis en el músculo de este ratón, además de provocar cambios en la expresión de proteínas y enzimas que intervienen en el sistema de control oxidativo y aumenta la expresión de otras proteínas que intervienen en el crecimiento y regeneración muscular (**Figura 8**) (Ramirez-Sanchez et al., 2014).

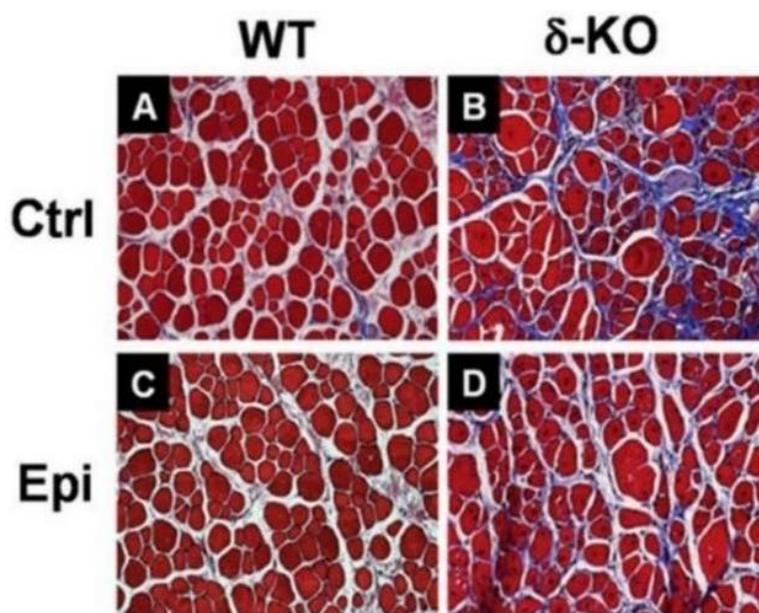


Figura 8 Efectos de (-)-epicatequina sobre la fibrosis tisular. Se utilizó la tinción tricromica de Masson en secciones de tejido de cuádriceps. Los ratones distróficos δ -KO evidenciaron altos niveles de fibrosis en ME (B) que se normalizaron con el tratamiento (-)-epicatequina (D). (Ramirez-Sanchez et al., 2013)

Adicionalmente se han demostrado efectos en otros tejidos como en músculo cardiaco; se encontró que con estímulo de (-)-epicatequina, se activa la vía de señalización de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)/ proteína quinasa B (Akt) y Ca^{2+} /proteína quinasa II dependiente de calmodulina (Ca^{2+} /CAMI/CaMKII), que se ha asociado con la hipertrofia del músculo cardiaco tanto por atrofas fisiológicas como patológicas, induciendo un aumento en la masa cardiaca en modelo v murino, de manera similar a como se ve incrementado en el ejercicio (De los Santos et al., 2017). Aunado a esto se ha observado en nuestro grupo de trabajo que Epi aumenta la expresión del miRNA 206, el cual es una clase de miRNA expresado en músculo cardiaco y músculo esquelético, identificados como determinante esencial en el desarrollo y la regeneración muscular. Por otro lado, se han evaluado los

efectos de (-)-epicatequina en modelos *in vitro*, exhibiendo un incremento en la expresión de cadena pesada de miosina (MHC), MyoD y Miogenina aumentando la conversión miogénica de los fibroblastos (*Lee et al., 2017*).

Aunque los mecanismos mediante los cuales este flavonol induce sus efectos en el músculo esquelético, no se han esclarecido completamente, ofrece un panorama beneficioso como una terapia coadyuvante efectiva contra el desgaste muscular secundario a diversas patologías o eventos fisiológicos. Por tal motivo, en el presente trabajo lo que se busca determinar es si el uso de epicatequina favorece a nivel molecular la hipertrofia del músculo esquelético, proponiéndose como una alternativa terapéutica coadyuvante en diferentes patologías.

3. JUSTIFICACIÓN

El tejido muscular interviene en un conjunto de funciones metabólicas significativas, es por ello que la falta de masa muscular puede asociarse directa o indirectamente a una mayor probabilidad de sufrir enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Estas enfermedades, pueden observarse con mayor frecuencia durante el envejecimiento y en patologías genéticas como la DMD. De acuerdo con el Censo de Población y Vivienda 2020 del [INEGI](#), la prevalencia de alguna discapacidad en México es del 4.9 % en la población total del país; y de este porcentaje, el 48% corresponde a discapacidad motriz. La distribución por edad, corresponde a la mayor parte en el grupo de mayores de 60 años concentrado en el 40.9%, causado principalmente por sarcopenia con una prevalencia de entre 15 y 20 por ciento, la cual se va incrementando conforme aumenta la edad.

La [secretaría de salud](#) divide por grupos la frecuencia de sarcopenia en adultos mayores, siendo de 60 a 70 años una frecuencia de alrededor del 5 y 10 por ciento, para los adultos de 70 a 80 años de entre el 10 y el 15 por ciento. los de edad comprendida entre 80 a 90 con un 15 a 20 y finalmente los mayores de 90 años pueden llegar a presentar hasta un 30 a 40 por ciento de frecuencia. Como ya se mencionó antes, la sarcopenia puede ser progresiva y los síntomas comunes son: debilidad, cansancio y falta de energía, por lo que la actividad física resulta inverosímil como alternativa terapéutica.

Por otro lado, la [DMD](#) es una enfermedad infantil de origen genético, que afecta a uno de cada 3 mil 500 recién nacidos a nivel mundial. Esta enfermedad se caracteriza por la debilidad muscular progresiva, la cual se detecta de los tres a los cinco años de edad con pronóstico grave. Los niños que portan esta enfermedad, no caminan, presentan dificultad para marchar y la debilidad muscular tiende incrementarse conforme van creciendo. Esta condición, se encuentra dentro del grupo de enfermedades raras o también llamadas huérfanas a nivel mundial, pues éstas no tienen cura.

Por este motivo, en este trabajo se busca determinar a nivel molecular el efecto de la Epicatequina sobre los factores reguladores miogénicos y la hipertrofia, para proponerse como una alternativa terapéutica coadyuvante en patologías del ME.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del flavonol (-)-epicatequina sobre la expresión de factores reguladores miogénicos y la hipotrofia de las fibras musculares mediante ensayos de western blot y análisis histológicos del músculo esquelético en ratones sanos, para proponerse como una posible alternativa terapéutica coadyuvante en patologías del músculo esquelético.

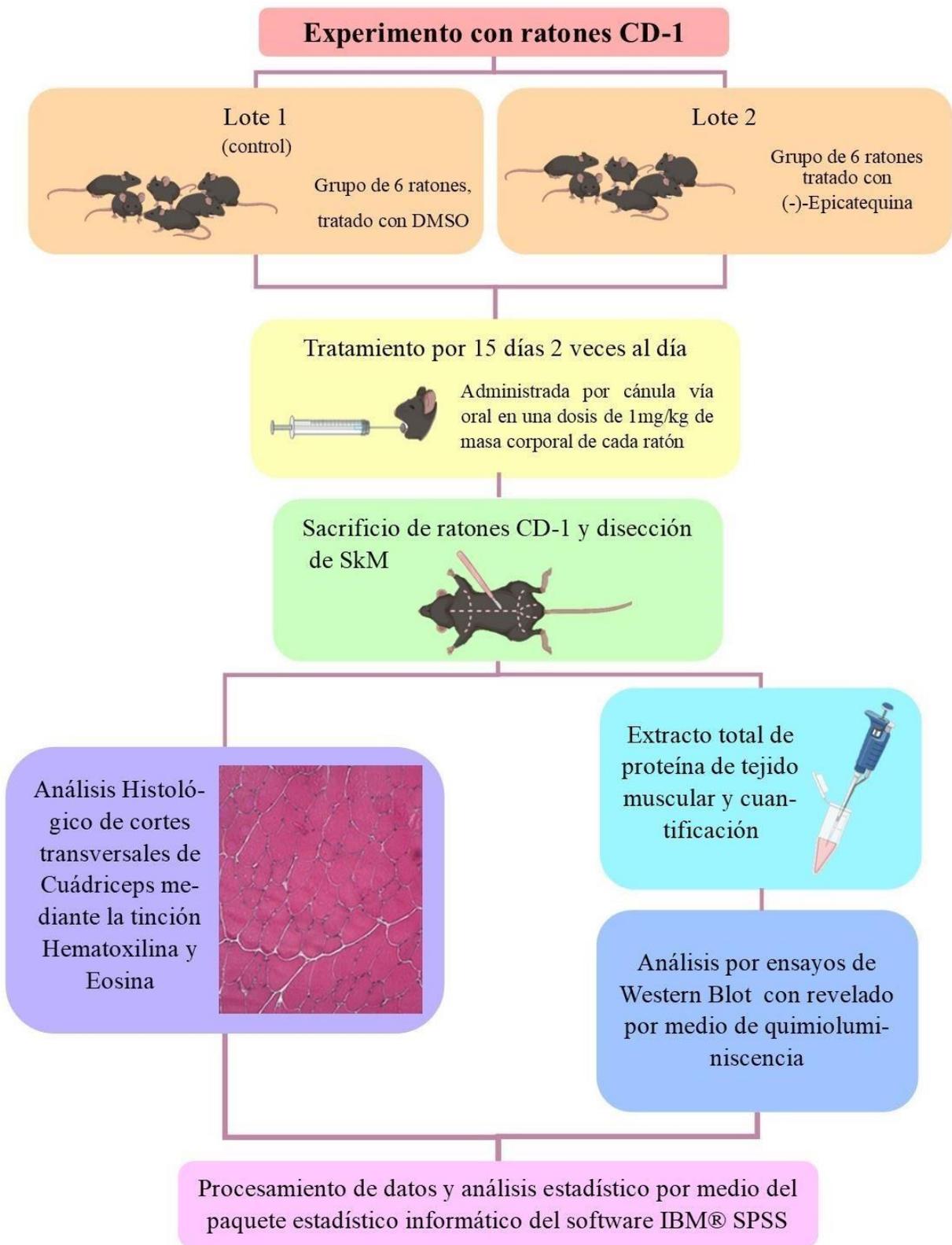
4.2. Objetivos particulares

- Control, mantenimiento y tratamiento de ratones tipo sanos con Epicatequina y DMSO cada 12 horas durante 15 días, en una dosis de 1 *mg/kg* de masa corporal de cada ratón.
- Obtención de las condiciones óptimas para llevar a cabo los ensayos de western blot y las técnicas histológicas para la tinción de tejido muscular.
- Determinación del área de las fibras musculares de ratones sanos CD-1 tratados con el Flavonol Epicatequina mediante microscopía de campo claro y tinción histológica con H&E,
- Evaluación de la expresión de factores reguladores miogénicos, MyoD y MyoG en extractos de proteína total de cuádriceps de ratones sanos CD-1 tratados con el Flavonol Epicatequina mediante ensayos de western blot y análisis densimétrico.

5. HIPÓTESIS

El tratamiento con el flavonol Epicatequina incrementará la expresión de los factores reguladores miogénicos y/o inducirá la hipertrofia de las fibras musculares en ratones sanos.

6. DIARAMA METODOLÓGICO



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Experimento con ratones CD-1

Se utilizaron doce ratones CD-1 a partir de los 2,5 meses de edad, distribuidos aleatoriamente en dos lotes. El primer lote control (Crl) se le administró DMSO (debido a que es el vehículo de disolución del flavonol Epi) y al segundo lote el fitoquímico (-)-epicatequina (Epi) en una dosis de 1mg/kg de masa corporal, por cánula oral dos veces al día (mañana y noche) durante dos semanas, calculado de la siguiente manera la dosis correspondiente para cada ratón; considerando que el peso de los ratones oscila entre los 17 y 18 g:

$$18 \text{ g}_{\text{peso del raton}} \left(\frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \left| \frac{1 \text{ mg}_{\text{Epic}}}{1 \text{ kg}_{\text{peso del raton}}} \right. \right) = 0.018 \text{ mg}_{\text{Epi}}$$

El tratamiento se basó en un estudio previo que indicó los efectos beneficiosos de Epi sobre los tejidos musculares (Gutierrez-Salmean et al., 2014). Extracción de músculo de ratones CD-1

Después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados con ketamina y sedación con Xilazina seguida de dislocación cervical. Luego, el músculo esquelético (cuádriceps femoral, Q.A.) se diseccionaron siguiendo la localización de la *figura 9* e inmediatamente se almacenó a -80 ° C hasta su posterior uso.

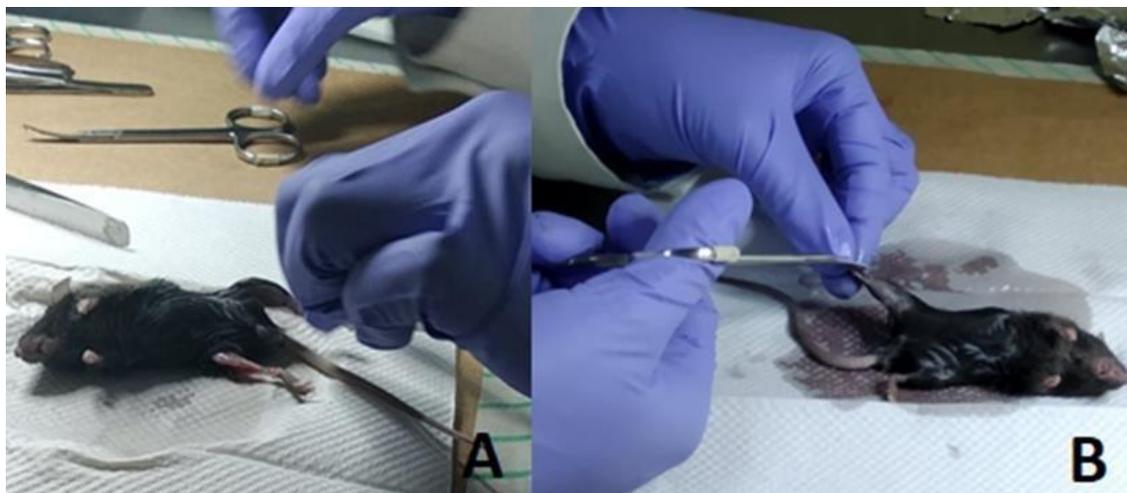


Figura 9 A) Sacrificio de los ratones por medio de una inyección de pentobarbital. B) Disección de los tejidos de las piernas de los ratones

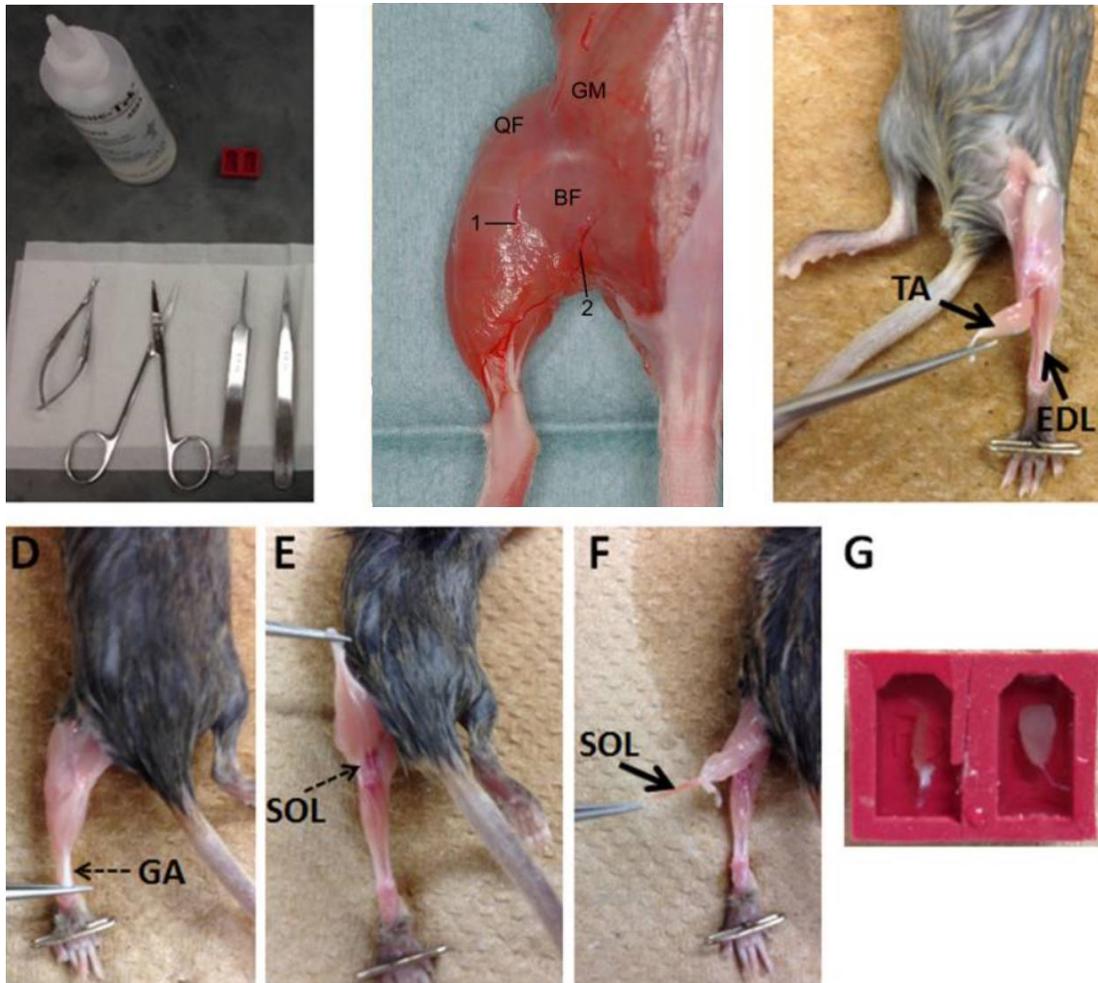


Figura 10 Músculos de referencia para la extracción de los ratones Se puede observar el músculo tibial anterior (TA), por debajo del tibial se observa el músculo extensor largo de los dedos (EDL), de lado vertical de la pierna se observa el gastrocnemios (Gas), por debajo del gastrocnemios, se puede observar el solio (Sol)(Kochi *et al.*, 2013) y finalmente en la parte superior interna el cuádriceps femoral (QF)(Wang *et al.*, 2017)

Cabe resaltar que el comite de ética aprobó el experimento con animales de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki) y las Directrices de los Estados Unidos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Recursos Animales de Laboratorio autorizados en México por la Academia Nacional de Medicina de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Adicionalmente, obtuvimos la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (No. CICUAL-04/15-08-2014) de la Facultad de Medicina del Instituto Politécnico Nacional de México.

7.2. Histología

Después de la disección de las muestras del ME, los Q.A. se incrustaron con Tissue-Tek y posteriormente se congelaron en 2-metilbutano para almacenarlos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el procesamiento. Para la evaluación de la morfología muscular, se obtuvieron secciones transversales seriadas de $10\text{ }\mu\text{m}$ de espesor mediante el uso de un criostato preenfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Más tarde, las criosecciones se sometieron a tinción de hematoxilina y eosina, de la siguiente manera:

Se llevaron los portaobjetos del congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a temperatura ambiente y se procedió a incubar los portaobjetos en cada una de las soluciones con los tiempos establecidos en la **Tabla 1**; una vez terminado el tren de tinción (**Figura 11**), (Wang et al., 2017) se colocaron en una campana de extracción hasta que quedaron secos.

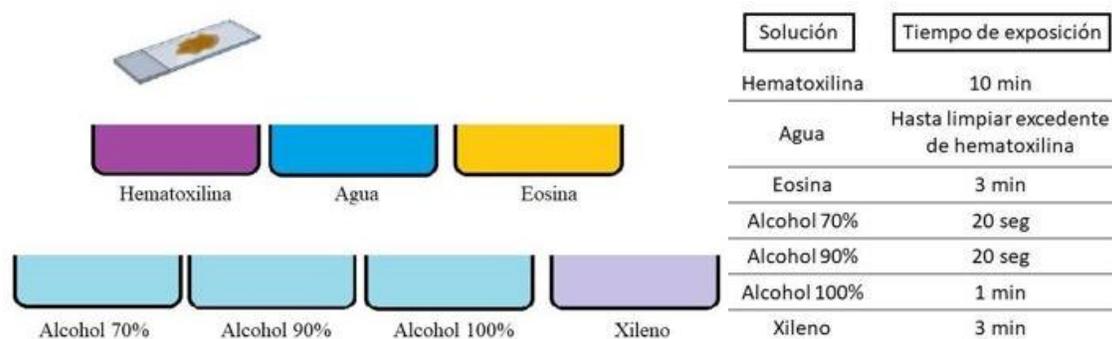


Figura 11 Representación gráfica del carril de tinción H&E para las muestras del SkM. (Gutierrez-Salmean et al., 2014)

Tabla 1 Soluciones para la tinción con el tiempo de exposición para los portaobjetos

Se ensamblaron con medios de montaje a base de xileno y se cubrieron con portaobjetos. Los portaobjetos se guardaron a temperatura ambiente.

Finalmente, la medición del área de sección transversal se realizó utilizando el software AxioVision (Zeiss) en 1200 secciones.

7.3. Extracto total de proteína de tejido

Para realizar el extracto total de proteínas de cada músculo, se cortó y pesó 100 mg de tejido, posteriormente cada sección de tejido fue macerado con nitrógeno líquido en un mortero. Una vez que, el tejido fue pulverizado, se vació en un tubo de 1.5 ml, al cual se le agregó 400 μl de buffer de lisis y 10 μl de inhibidores.

Finalmente, la suspensión se vortexó 3 veces cada 5 segundos, con reposos de 10 segundos entre cada ciclo y se dejó en el rotor orbital durante 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 13500 rpm durante 10 min a 10°C, y se recuperó el sobrenadante, el cual contiene las proteínas totales de cada muestra de tejido. El sobrenadante se cuantificó por medio de una curva de calibración y se guardó a -20°C.

7.4. Cuantificación de extracto total de proteína (ETP)

Para la cuantificación de proteína se realizó una curva de calibración a partir de un stock 1mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) (**Tabla 2**).

Tubos	Vol. Final	µl de stock BSA	µl de H ₂ O	Concentración mg/ml
1	100 µl	5 µl	95 µl	0.05
2	100 µl	10 µl	90 µl	0.1µl
3	100 µl	20 µl	80 µl	0.2µl
4	100 µl	30 µl	70 µl	0.3 µl
5	100 µl	40 µl	60 µl	0.4 µl
6	100 µl	50 µl	50 µl	0.5 µl
7	100 µl	0 µl	100 µl	0

Tabla 2 Disoluciones del stock de BSA para la preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas

Para poder leer las muestras de ETP fue necesario diluirlas 1/10. Posteriormente se colocó en una microplaca de 96 pozos 10 µl tanto para la curva como para las muestras y 200 µl de reactivo de Bradford diluido 1:5 con agua inyectable.

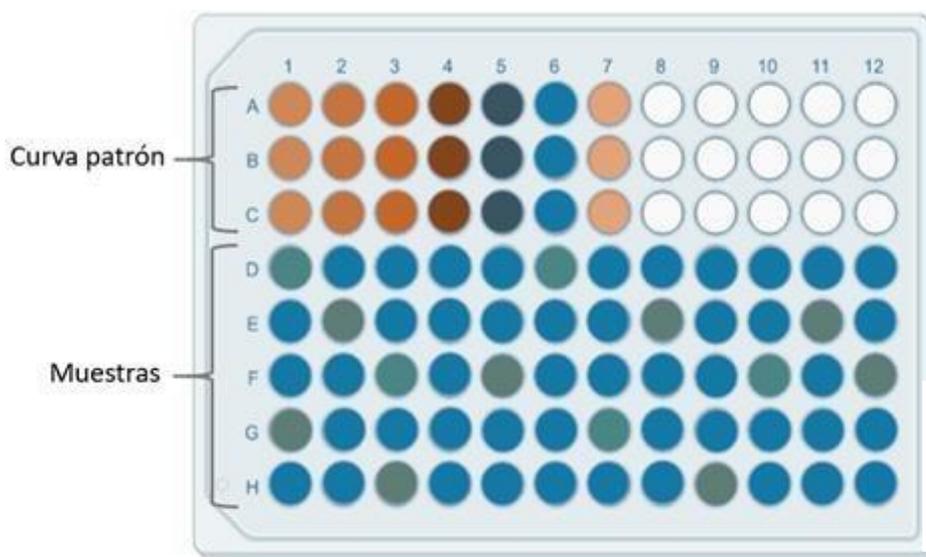


Figura 12 Llenado de las muestras en la microplaca para la lectura del espectrofotómetro

Se leyó en un espectrofotómetro de microplacas xMark™ controlado por un software basado en una computadora de escritorio (PC), y los datos se registraron en un archivo en la PC.

7.5. Integridad del extracto total de proteína

Para poder determinar la integridad del EPT se realizó un gel para separación de proteínas por dodecilsulfato de sodio (SDS)-Poliacrilamida discontinua vertical (**tabla 3**).

Tipo de gel	Gel	H ₂ O	Acrilamida	Buffer		SDS	APS	TEMED
				pH= 8.8	pH= 6.8			
Concentrador	3%	3.2 ml	0.5ml	-	1.25	0.05ml	25µl	5µl
Separador	8%	2.35 ml	1.35 ml	1.25	-	0.05ml	25µl	2.5µl

Tabla 3 Volúmenes correspondientes para la preparación de los geles de poli(acrilamida) al 3% y 8%

Se agregó en un cartucho la solución del gel separador y se dejó polimerizar aproximadamente 20 min; una vez polimerizado se agregó la solución del gel concentrador y se dejó polimerizar. Posteriormente la muestra se trató con SDS (a mayor concentración que en la composición del gel) con β-mercaptoetanol y se calentó por 5 min a 90-100°C, para provocar la desnaturalización y para reducir los puentes disulfuro, separando así las subunidades de la proteína y permitiendo que se extiendan por efecto del SDS.

Se colocó por pozo 50 µg de extracto total de proteína y se corrió con un buffer de corrida preparado con 30.3g de Tris base, 144g de glicina, 10g de dodecilsulfato de sodio (SDS) y aforado a 1L con H₂O destilada, pousando las siguientes cond8iciones: 60 min 100 volts 40 mA (**Figura 13**).

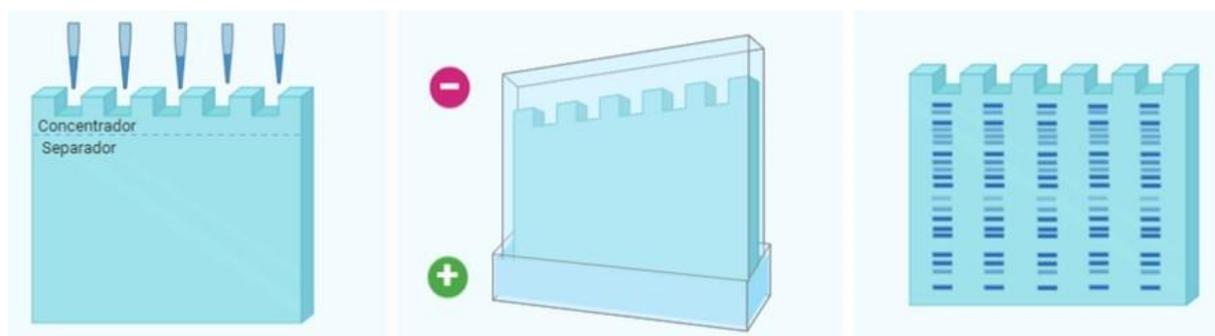


Figura 13 Representación gráfica del llenado de cada pozo del gel de poli(acrilamida), así como el flujo de corrimiento de las proteínas respecto a su carga

Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con azul coumassie al 0.05% por 30 min en agitación constante; posteriormente se destiño por 3 horas en H₂O cambiándola cada hora.

7.6. Western blot

7.6.1. Electroforesis

Para la electroforesis se usaron geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por las siglas en inglés de Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis, del 8% y del 2 al 14% (éste último en gradiente), los cuales fueron utilizados a una condición de 90 Volts durante 150 minutos

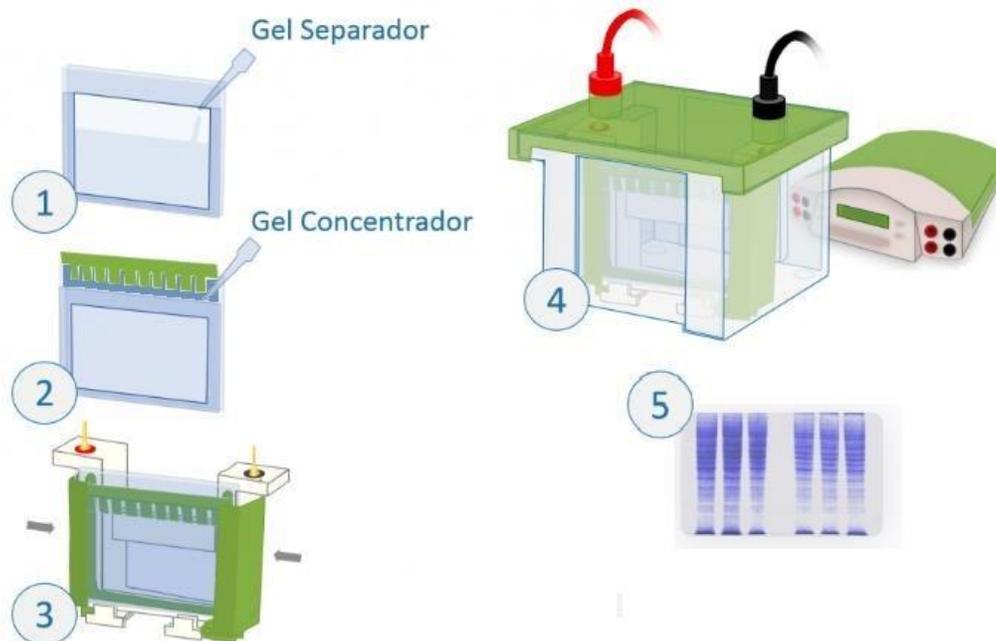


Figura 14. Formación del gel. 1 empezando por el gel separador en la base; 2 en la parte superior se agrega el gel separador, diseñado para formar los pozos donde se coloca la carga proteica. 3. El cartucho de corrida se conecta a la fuente de poder por medio de los electrodos y se coloca el buffer de corrida montado en el tanque (4) y se conecta y programa a la fuente de poder. 5. Una vez terminada la corridas se retira el gel y se tiñe con Coomassie(Chrambach and Jovin, 1983; Laemmli, 1970, p. 4; McLellan, 1982; Ornstein, 2006).

Por pozo se cargan 50 μl de muestra calculado de la siguiente manera:

$$50 \mu\text{g} \left\langle \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \middle| \frac{1 \text{ ml}_{\text{muestra}}}{\text{mg}_{\text{muestra}}} \middle| \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \right\rangle = \mu\text{l}_{\text{por pozo}}$$

Se agrega 1 μl de Buffer de carga por cada 3 de extracto total de proteína; es decir que si se requiere tomar 3 μl de extracto se debe agregar 1 μl de Buffer de carga para ver su desplazamiento a lo largo del gel. Una vez cargado cada pozo, se corre por 60 min 100 volts 40 mA; posteriormente el gel se tiñe en Azul de coomassie y se destiñe por 3 horas obteniendo el siguiente gel (**Figura 18**).

7.6.2. Transferencia

La transferencia se realizó en un sistema húmedo, utilizando Buffer de transferencia (Tris-base y glicina) al 20% de metanol, a una condición de 250 mA durante 180 min a 4°C.

7.6.3. Western blot

Para poder revelar las proteínas se cortaron las membranas de nitrocelulosa a la altura aproximada de la proteína a estudiar y se lavó en rojo Ponceu con solución salina tamponada con tris y 0,1% de Tween (TBST) por lo menos 2 veces entre 1 o 2 min. Posteriormente se incubó 1 hora con solución bloqueadora a T_{amb} y se realizaron 3 lavados de 15 min, para incubarse de nuevo en el anticuerpo primario por 16 horas en agitación constante a 4°C.

Una vez trascurrido el tiempo, se hicieron 3 lavados con TBST de 15 min cada uno y se dejaron incubando con el anticuerpo secundario por 1 hora disueltos en leche. Posteriormente se realizaron 4 lavados en TBST por 15 min.

Proteína	Peso molecular	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
MyoG	30 kDa	Ratón	Anti-Ratón
MyoD	37 kDa	Ratón	Anti-Ratón
GAPDH	37 kDa	Conejo	Anti-Conejo

Tabla 4 Peso de las proteínas estandarizadas, así como los anticuerpos correspondientes y la nomenclatura del control negativo que se utilizó

Al finalizar los últimos lavados, se procedió al revelado de las membranas con Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate de ThermoFisher #cat 34095. El volumen ocupado dependió del tamaño de la membrana a revelar. Con las membranas en TBST, se escurrieron por 40 segundos para colocar sobre el lector, previamente colocada la solución de revelado y evitando la presencia de burbujas. Las imágenes se obtuvieron mediante C-DiGit® Blot Scanner y haciendo uso del programa Image Studio™ Lite para el análisis densitométrico.

7.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos incluyeron al menos tres réplicas biológicas. Se utilizó la prueba T de Student de dos colas para determinar las diferencias significativas entre el grupo de control y el grupo tratado. $P < 0,05$ indica una diferencia estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS

8.1. Estandarización de la tinción hematoxilina y eosina (H&E).

Para iniciar la evaluación de la morfología muscular, se obtuvieron primero las secciones transversales seriadas de 10 µm de espesor mediante el uso de un criostato preenfriado a -20°C, para poder observar que el tejido estuvo bien colocado se sometieron a tinción de hematoxilina y eosina, buscando estandarizar la tinción a la par.

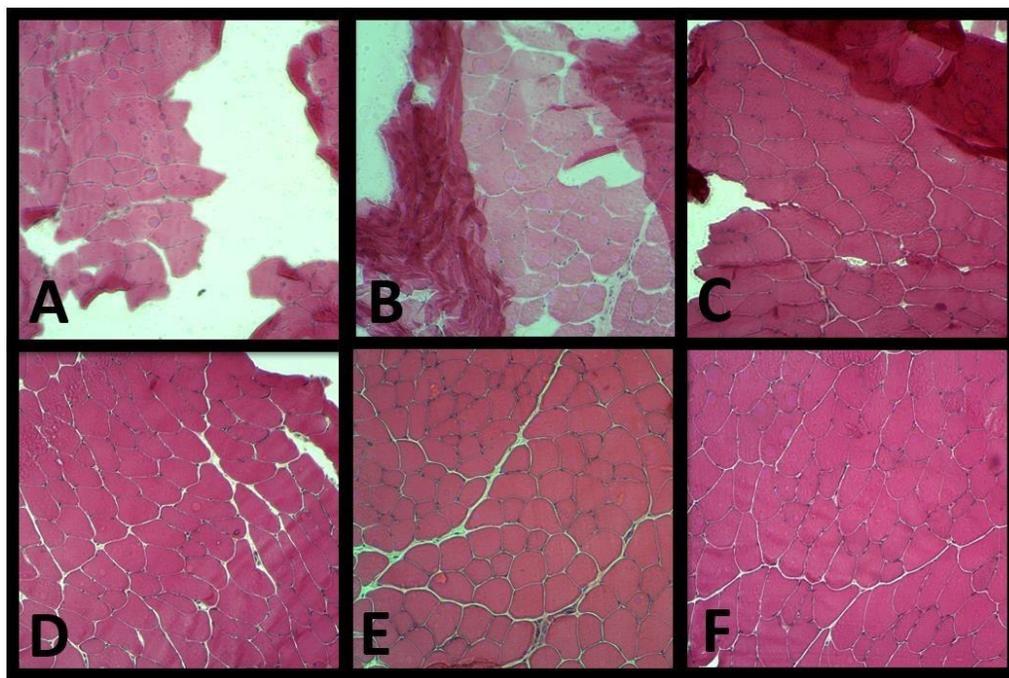


Figura 15 Estandarización del corte y la tinción H&E. Se puede observar gradualmente como se iba mejorando el corte del tejido. Fotografías de microscopía simple (100X)

El corte y fijación del tejido en el portaobjetos fue mejorando entre un tejido y otro como se observa en la **figura 15**, cabe mencionar que la **Figura 15A** el corte se hizo en la punta del QA por lo que el tejido en esta zona estaba comprometido con el Tissue-Tek, mientras más se desgastaba el tejido mejor salían los cortes como se observa en la **figura 15F**.

En cuanto a la estandarización de la tinción H&E fue necesario filtrar la hematoxilina por la cristalización que ya empezaba a hacerse, pero al seguir el carril de montaje la última parte con los medios de montaje a base de xileno al momento de cubrir con portaobjetos se generó burbujas muy evidentes como se ve en la **figura 14A y D**, por lo que se modificó esperar un

Para cada imagen se tomaron aleatoriamente 20 fibras y se midió su área, obteniendo 20 datos expresados en la tabla, como se muestra en la **figura 16**, de esta tabla que arroja el software solo se utiliza la primera y tercera columna; cómo se puede observar; el número de área se obtuvo en μm^2 .

Una vez analizado todas las imágenes, se agrupan los datos por el ratón que se analizó; por lo tanto, se obtuvieron 1200 fibras totales, de las cuales 600 corresponden a las fibras de los ratones tratados con Epi y 600 correspondientes a las fibras de los ratones control. Esta agrupación se analizó de manera estadística con el software IBM SPSS Statistics 26, a partir del análisis t de student.

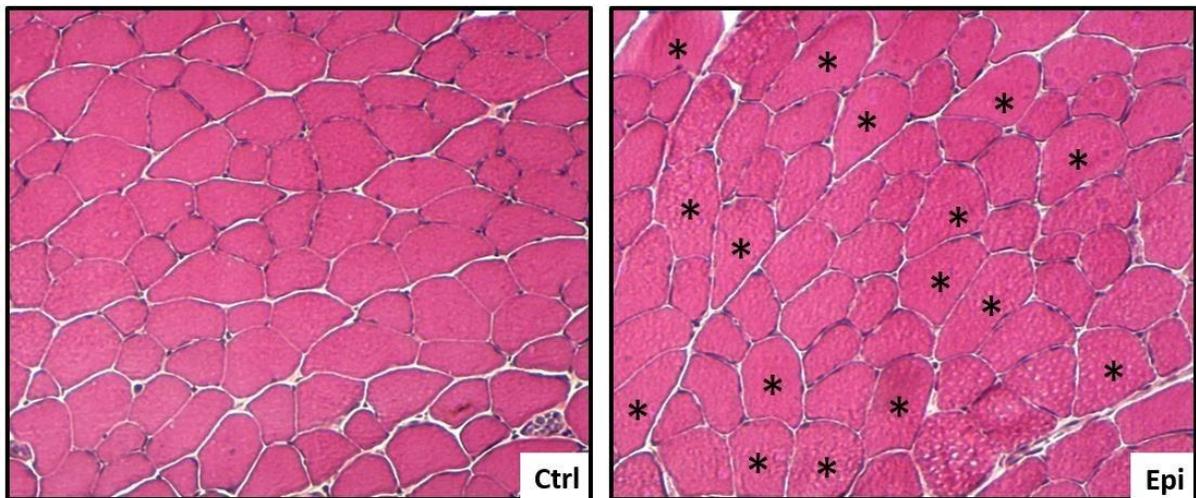


Figura 17 Fotografías de cortes transversales de Q.A. de ratón bajo la tinción H&E tomada por microscopía simple (100X) Se puede observar el comparativo de las fibras musculares del ratón control vs el tratado con Epi.

En la **figura 17** se puede observar las diferencias de tamaño que existen entre las fibras de los ratones control vs los tratados con Epi, las fibras seleccionadas en asterisco (*) en el corte transversal del Q.A. se pueden ver mas grandes; es decir, el area de estas fibras es más grande en comparacion con demas fibras del corte, si comparamos estas con el corte transversal del Q.A. control, se puede observar que no tienen el mismo tamaño que las fibras tratadas con Epi. Esta diferencia entre ambos cortes se puede ver de manera estadística, como se ve en el grafico 1 se puede observar que el area de las miofibras tratadas con Epi representan una mayor area en comparacion con las miofibras control, mostrando una diferencia significativa con un valor de $p = 0.019$.

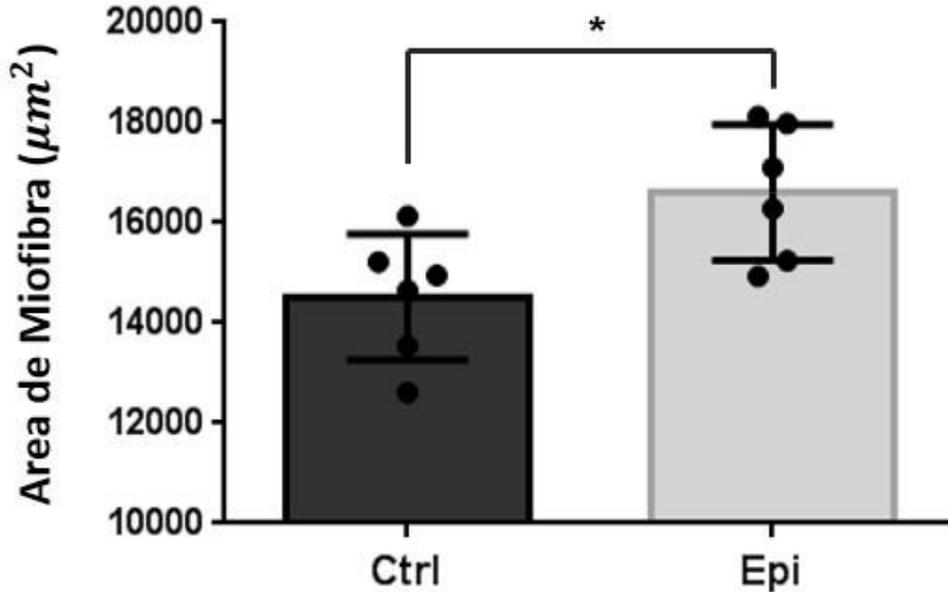


Gráfico 1 Comparación entre las miofibras tratadas con (-)-Epicatequina vs las miofibras control. El histograma de la zona muestra la distribución de celdas en Ctrl (barras negras) y grupo Epi (barras grises), el aumento significativo del tamaño del área en las fibras de los ratones tratados con Epi. *p= 0.019 vs. grupo Ctrl por prueba t de Student, n = 1200).

Una vez visto el efecto del flavonol (-)-epicatequina de manera histológica, procedimos a realizar el análisis de proteína para poder determinar el efecto que produce a nivel molecular.

8.3. Estandarización western blot

8.3.1. Cuantificación del ETP.

Las proteínas forman un complejo colorido con azul brillante de Coomassie o Bradford, el color es directamente proporcional a la concentración, esto es; a mayor concentración mayor intensidad de color. Con base en estas propiedades, se realizó la cuantificación por espectrofotómetro de placa a partir de un patrón externo. Se generó una curva patrón a diferentes concentraciones conocidas, y se leyeron las muestras a 595 nm, con las absorbancias obtenidas se realizó un gráfico de concentración vs absorbancia. En el **gráfico 2**, se observa el comportamiento del extracto de concentración de proteínas.

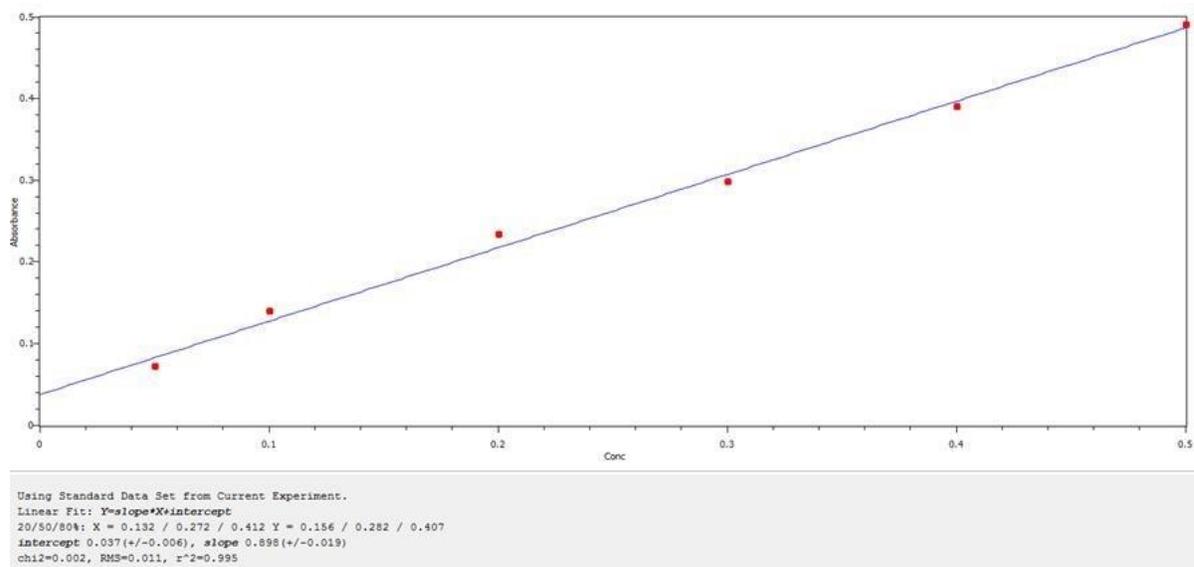


Gráfico 2 Curva de calibración de la proteína estándar a una longitud máxima de 595nm, con los valores de la ecuación de la recta

Standards Report:

Std #	Conc	Well	Replicates	Mean	SD	%CV
1	0.05	A1	0.079	0.072	0.006	8.929
		B1	0.069			
		C1	0.067			
2	0.1	B2	0.130	0.140	0.013	9.608
		C2	0.149			
3	0.2	A3	0.228	0.234	0.008	3.326
		C3	0.239			
4	0.3	A4	0.300	0.299	0.011	3.549
		B4	0.287			
		C4	0.308			
5	0.4	A5	0.402	0.390	0.017	4.348
		C5	0.378			
6	0.5	A6	0.501	0.491	0.014	2.878
		C6	0.481			

Tabla 6 Concentraciones de la curva de calibración con la media de las absorbancias consideradas para la regresión lineal

Para cuantificar las proteínas, y disminuir el efecto del error por medio de un cálculo estadístico, se prepararon las muestras por triplicado como se muestra en la **tabla 18**, donde se observa la media de las absorbancias considerada para la regresión lineal.

De los cálculos obtenidos, se les aplicó el factor de dilución para conocer la concentración real de proteínas; es decir, se disolvió 1 μl de muestra en 40 μl de $H_2O_{\text{inyectable}}$ es necesario aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentracion de la dilucion} \left(\frac{40 \mu\text{l}}{1 \mu\text{l}} \right) = \text{Concentracion real de la muestra}$$

8.3.2. Integridad del ETP

Considerando que las proteínas están formadas por cadenas aminoácidos que requieren plegarse, es decir adquirir su conformación nativa, con la finalidad de generar una estructura y función determinada; la purificación de proteínas consta de que la muestra se divida en fracciones a lo largo de todo el proceso hasta obtener el extracto total de proteínas (ETP) por lo que es posible que durante la purificación la muestra se dañe. Para poder observar proteínas íntegras se debe ver una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó ETP. Si está fragmentada, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra que cortan a lo largo las proteínas (*Velázquez et al., n.d.*).

Para conocer la integridad de las proteínas, de un gel de poliacrilamida discontinua vertical, que contienen dodecil sulfato de sodio, denominando esta técnica como “SDS-PAGE”. Las placas de gel de poliacrilamida se forman por la co-polimerización de la acrilamida para lo cual se utiliza un agente entrecruzador como la N,N'-metilen *bis*-acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina) SDS-Poliacrilamida utilizando 2 geles un concentrador localizado en parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras en una concentración del 3%, y el separador que forma el cuerpo del gel por donde migrarán y se separarán las proteínas en una concentración al 8% (**figura 18-1 y 2**) (*Pérez et al., 2015; Peterson et al., 1975*). Cuando se muestran las bandas bien definidas de cada muestra en el gel, indica que el extracto de total de proteína está completamente integro.

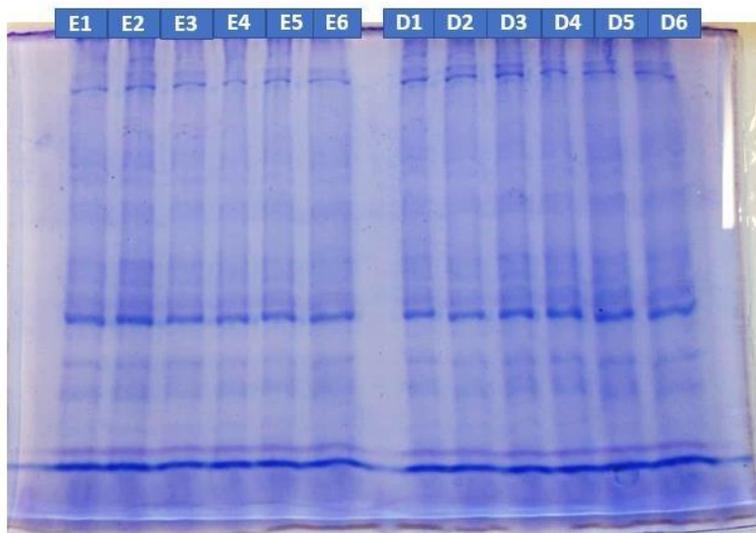


Figura 18 Gel de integridad al 8% para el extracto total de proteína de E1 al E6 y de D1 al D6 teñido con azul de coumassie

Por otro parte, si el voltaje o el amperaje fluctúa demasiado provoca un efecto en las bandas de las proteínas, como se muestra en la **figura 19** al final de cada pozo se observa el frente de corrida (marcada como una línea continua azul); por debajo del frente de corrida, se pueden observar proteínas de peso molecular más pequeños que se eluyen así debido al poro del gel de acrilamida.

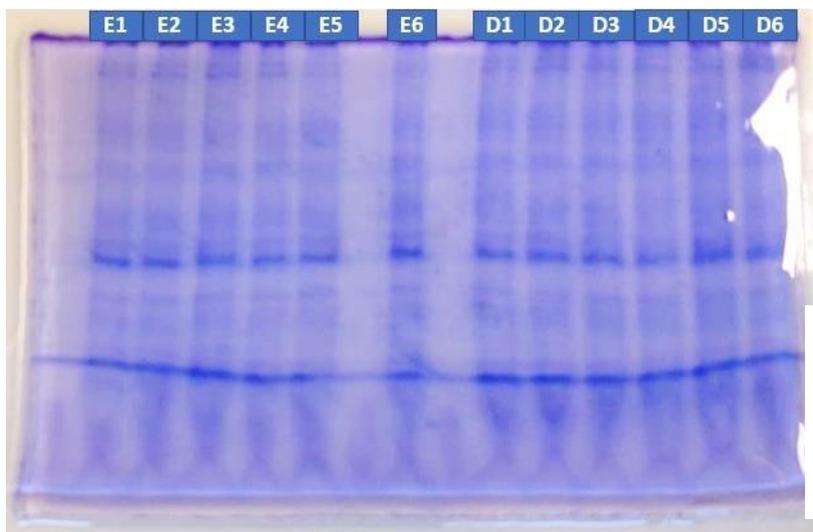


Figura 19 Gel de integridad al 8% para el extracto total de proteína de E1 al E6 y de D1 al D6 teñido con azul de coomassie

8.3.3. Estandarización de la inmunotransferencia

Una vez revisada la integridad de ETP, se estandariza la electroforesis; se prepararon geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a diferentes concentraciones, para obtener condiciones donde las proteínas de estudio se prepararon en condiciones óptimas de los geles a las concentraciones de 8% para el concentrador y del 2% al 14% para el separador (éste último

en gradiente), bajo las siguientes condiciones de potencial eléctrico y tiempo de 90 Volts durante 150 minutos.

Para la transferencia se realizaron pruebas en un sistema húmedo, utilizando buffer de transferencia (Tris-base y glicina) al 20% de metanol, a diferentes condiciones, buscando las mejores condiciones de transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa, quedando a una condición de 250 miliamperes durante 180 minutos a 4°C.

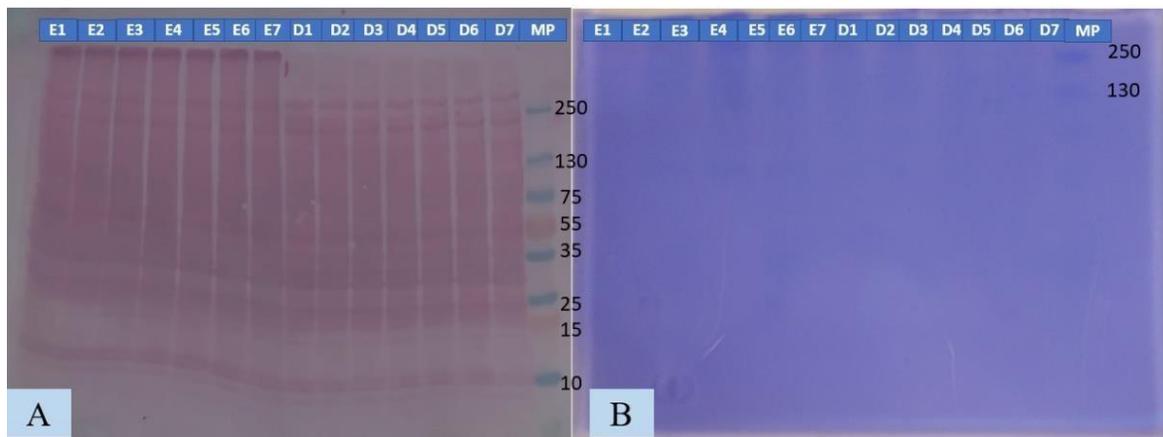


Figura 20 **A)** Membrana transferida de miotubos (D1-D7 y E1-E7) teñida en rojo de ponceu y **B)** Gel de Poliacrilamida después de la transferencia teñido con azul de coumassie

Como se observa en la **figura 20 A** la transferencia de las proteínas fue casi en su totalidad, para comprobar que se efectuó por completo, se puede observar que en la **figura 20 B** el gel no presenta proteínas más que en la parte superior, las cuales corresponden a proteínas con un peso molecular por arriba de los 250 kDa, en nuestro caso esa pequeña cantidad de proteínas no afecta al momento de hacer el análisis de western blot debido a que las proteínas que buscamos están por debajo de ese peso molecular entre los 55 kDa y 25 kDa.

Alguno de los problemas más comunes al momento de realizar la transferencia es que las proteínas se degradan al momento de realizar la electroforesis por lo que al momento de transferir se observa una línea vertical a lo largo del pozo transferido lo cual indica que las proteínas transferidas están fragmentadas y por lo tanto la concentración de estas se verá afectada (**Figura 21**). Por otro lado, si no se controla la temperatura al momento de transferir, el metanol que se encuentra en el buffer de transferencia empieza a evaporar, dejando en la membrana huecos vacíos (**figura 23**), lo cual transferir correctamente la proteína implica que la concentración de esta se ve afectada por lo que en estas condiciones no se puede utilizar

esa membrana para análisis de western blot ya que no hay proteínas completas para un buen análisis. Como se observa en la **figura 22** es la forma correcta de ver una membrana transferida, con las bandas bien definidas y las proteínas de carga en paralelo con el marcador de peso.

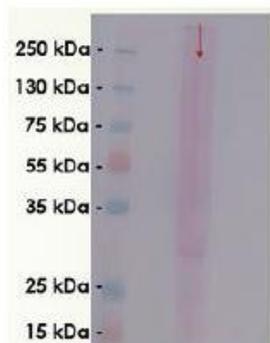


Figura 21 Membrada de transferencia con las proteínas degradadas, teñida en rojo ponceu

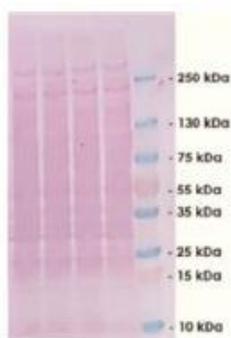


Figura 22 Membrada de transferencia en condiciones ideales

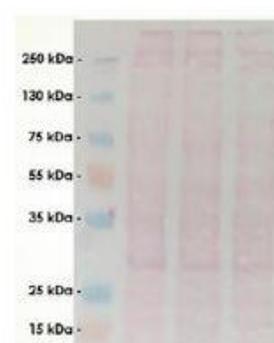


Figura 23 Membrada de transferencia con marcas de la evaporación del buffer de transferencia, teñida en rojo ponceu

8.3.4. Estandarización del western blot

Una vez obtenida la membrana, se corta de acuerdo con el peso molecular de la proteína a analizar; en nuestro caso se estandarizaron 2 proteínas reguladoras miogénicas MyoD y MyoG, ya que se ha demostrado que MyoD y la miogenina regulan la expresión diferencial de genes musculares en músculo adulto;(Antoniou et al., 2014) como control negativo se estandarizó la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) debido a que casi todas las células expresan GAPDH de manera constitutiva y su expresión permanece relativamente constante bajo estrés; además que cataliza el sexto paso de la glucólisis y su actividad contribuye a la producción de energía celular (*Hou et al., 2017*). Se precedió a estandarizar las condiciones de western blot en todo el pozo con un control que solo se bloqueó con el anticuerpo secundario, dependiendo si era anti-conejo o anti-ratón, como se puede observar en la **figura 23** a las 3 proteínas estandarizadas GAPDH con una masa molecular (MM) de 37 KDa, MyoG con un (MM) de 30 KDa y MyoD con un MM de 37KDa.

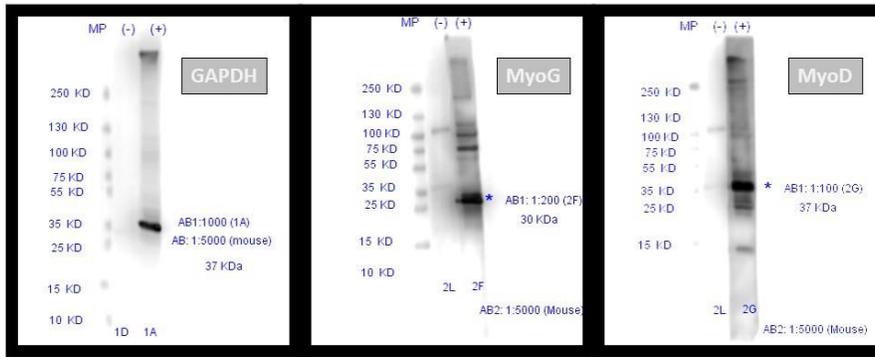


Figura 22 Western blot de las proteínas GAPDH (1A) y su control negativo (1D), MyoG (2F), MyoD (2G) y su control negativo (2L)

8.4. Análisis de la expresión de MyoG y MyoD

Concluidos los últimos lavados, se procedió al revelado de las membranas con Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate de ThermoFisher #cat 34095; previamente colocada la solución de revelado y evitando la presencia de burbujas, se obtuvieron las imágenes de la **figura 24**, a partir del C-DiGit® Blot Scanner. Se puede observar la altura aproximada de los cortes de las membranas de lado izquierdo, así como los niveles relativos entre las proteínas de la miofibras control vs las tratadas con Epi; así como el control de carga GAPDH que se mantiene constante. MyoD en las 3 membranas tiene un mayor incremento en las miofibras tratadas con Epi esto comparado con el incremento de MyoG, que se ve ligeramente con un menor incremento.

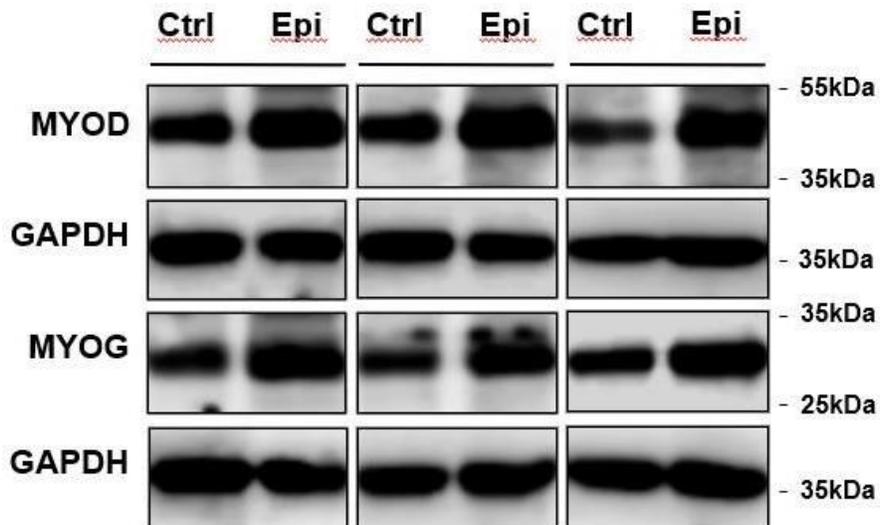


Figura 23 Imágenes de western blot de MyoD y MyoG de miofibras de ratones tratados con -(-) epicatequina vs su control. Se muestran los niveles relativos de las

miofibras tratadas vs su control por triplicado, así como el rango de masa molecular de cada proteína.

Se puede observar que el grupo tratado muestra un incremento significativo respecto al control, teniendo en el caso de MyoD $p= 0,0028$ y miogenina $p= 0,0031$ en las fibras del músculo esquelético de ratones tratados con epicatequina.

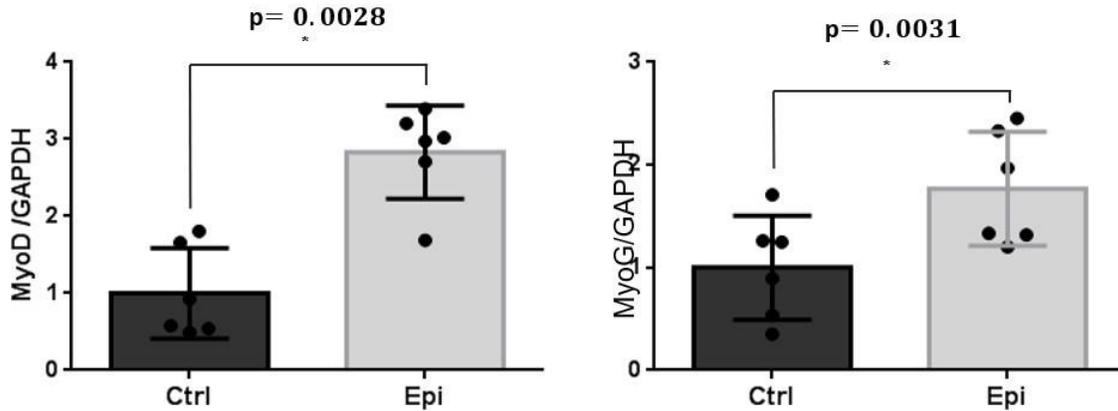


Gráfico 3 Gráfica de los niveles relativos de Miogenina y MyoD de los grupos tratados y controles. Se muestran los niveles relativos de MyoG y MyoD de las miofibras de los grupos tratado y su control, observando un incremento de la proteína con una significancia de una $p=0.0028$ para el caso de MyoD y de $p=0.0031$ para el caso de miogenina. Los gráficos de barras muestran el análisis de densitometría de proteínas/GAPDH. n= 6 animales. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

9. DISCUSIÓN

Se sabe que la actividad física induce cambios en distintas vías reguladoras del músculo esquelético; sin embargo en numerosas afecciones crónicas, en condiciones como las distrofias musculares, la caquexia y la sarcopenia; la pérdida muscular es avanzada y la realización de la actividad física resulta inverosímil como alternativa terapéutica; por lo que cada vez tiene más importancia la búsqueda de moléculas de origen natural para el desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de patologías musculares, como una opción al ejercicio que impulse la regeneración muscular; el flavonol (-)-epicatequina ha demostrado ser un fitofármaco que promueve la mejora del músculo esquelético durante un proceso regenerativo y ha sido clasificado como un mimetizador del ejercicio (*Lee et al., 2017; Petriz et al., 2017; Porter et al., 2015*).

A pesar de que muchos estudios recientes han demostrado que esta molécula ejerce efectos benéficos en el proceso de regeneración muscular, las vías de acción que emplea (-)-epicatequina aún permanecen sin esclarecerse en su totalidad; sin embargo, ofrece un panorama favorable como una terapia coadyuvante efectiva contra el desgaste muscular secundario a diversas patologías o eventos fisiológicos. Los estudios realizados por nuestro grupo demostraron que Epi también induce la biogénesis mitocondrial donde se observa un incremento en el nivel de proteína antioxidante y su actividad, teniendo un impacto favorable en múltiples mecanismos reguladores moleculares del músculo esquelético. Por lo que se planteó la hipótesis de que el flavonol epicatequina incrementará la expresión de los factores reguladores miogénicos y/o inducirá la hipertrofia de las fibras musculares en ratones sanos.

Considerando que MyoD y MyoG son reguladores relevantes del crecimiento muscular adulto se evaluó el nivel proteico de estos factores de transcripción en los ratones tratados con Epi, mostrando un incremento significativo en ambos casos el flavonol indujo un incremento significativo de MyoD ($p= 0.0028$) y miogenina ($p= 0.0031$) en las fibras musculares. Lo cual fue comparado con los datos obtenidos de la tinción H&E, donde se observa que Epi indujo la regulación de la hipertrofia de las fibras del músculo esquelético con un valor significativo de $p= 0.019$.

10. CONCLUSIONES

Considerando la regulación ascendente que el ejercicio induce en las vías reguladoras del músculo esquelético se debe en gran medida a la correlación con el aumento de las proteínas miogénicas MyoD y los niveles de miogenina y la hipertrofia de las fibras musculares. En esta investigación al evaluar el efecto del flavonol (-)-epicatequina sobre la expresión de factores de reguladores miogénicos, se considera que el incremento en la expresión tanto de MyoD y MyoG podría fungir como un posible coadyuvante al ejercicio; este estudio proporciona evidencia de que Epi puede inducir la regulación a la alza de los factores reguladores miogénicos MyoD y MyoG y la hipertrofia de las fibras del músculo esquelético.

11. REFERENCIAS

- Adhikari, A., Kim, W., Davie, J., 2021. Myogenin is required for assembly of the transcription machinery on muscle genes during skeletal muscle differentiation. *PLOS ONE* 16, e0245618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245618>
- Almada, A.E., Wagers, A.J., 2016. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing, and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 267–279. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.7>
- Antoniou, A., Mastroiannopoulos, N.P., Uney, J.B., Phylactou, L.A., 2014. miR-186 Inhibits Muscle Cell Differentiation through Myogenin Regulation. *J. Biol. Chem.* 289, 3923–3935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507343>
- Asfour, H.A., Allouh, M.Z., Said, R.S., 2018. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp. Biol. Med.* 243, 118–128. <https://doi.org/10.1177/1535370217749494>
- ASPECTOS BASICOS DE LA MIOGENESIS.pdf, n.d.
- Benatti, F.B., Pedersen, B.K., 2015. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases—myokine regulation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 86–97. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.193>
- Boldrin, L., Zammit, P.S., Morgan, J.E., 2015. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res.* 14, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.10.007>
- Bruusgaard, J.C., Johansen, I.B., Egner, I.M., Rana, Z.A., Gundersen, K., 2010. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15111–15116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913935107>
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F., 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* 202, 59–68. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x>
- Campo, A. del, Jaimovich, E., Tevy, M.F., 2016. Mitochondria in the Aging Muscles of Flies and Mice: New Perspectives for Old Characters. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/9057593>
- Camporez, J.-P.G., Petersen, M.C., Abudukadier, A., Moreira, G.V., Jurczak, M.J., Friedman, G., Haqq, C.M., Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2016. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2212–2217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525795113>
- Ceafalan, L.C., Fertig, T.E., Popescu, A.C., Popescu, B.O., Hinescu, M.E., Gherghiceanu, M., 2018. Skeletal muscle regeneration involves macrophage-myoblast bonding. *Cell Adhes. Migr.* 12, 228–235. <https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1346774>
- Chrambach, A., Jovin, T.M., 1983. Selected buffer systems for moving boundary electrophoresis on gels at various pH values, presented in a simplified manner. *Electrophoresis* 4, 190–204. <https://doi.org/10.1002/elps.1150040303>
- Clara, S., Clara, S., Clara, V., 2017. *Lupus eritematoso sistémico* 11, 14.
- de la Serna, I.L., Ohkawa, Y., Berkes, C.A., Bergstrom, D.A., Dacwag, C.S., Tapscott, S.J., Imbalzano, A.N., 2005. MyoD Targets Chromatin Remodeling Complexes to the Myogenin Locus Prior to Forming a Stable DNA-Bound Complex. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3997–4009. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.3997-4009.2005>

- De los Santos, S., García-Pérez, V., Hernández-Reséndiz, S., Palma-Flores, C., González-Gutiérrez, C.J., Zazueta, C., Canto, P., Coral-Vázquez, R.M., 2017. (–)Epicatechin induces physiological cardiac growth by activation of the PI3K/Akt pathway in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1600343. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600343>
- Egan, B., Zierath, J.R., 2013. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab.* 17, 162–184. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>
- Espondilitis anquilosante, 1994. , in: *Mother To Baby | Fact Sheet*. Organization of Teratology Information Specialists (OTIS), Brentwood.
- Forbes, S.C., Little, J.P., Candow, D.G., 2012. Exercise and nutritional interventions for improving aging muscle health. *Endocrine* 42, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9676-1>
- Fritzen, A.M., Thøgersen, F.D., Qadri, K.A.N., Krag, T., Sveen, M.-L., Vissing, J., Jeppesen, T.D., 2020. Preserved Capacity for Adaptations in Strength and Muscle Regulatory Factors in Elderly in Response to Resistance Exercise Training and Deconditioning. *J. Clin. Med.* 9, 2188. <https://doi.org/10.3390/jcm9072188>
- Gaitanos, G.C., Williams, C., Boobis, L.H., Brooks, S., 1993. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J. Appl. Physiol.* 75, 712–719. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.2.712>
- Ganassi, M., Badodi, S., Ortuste Quiroga, H.P., Zammit, P.S., Hinitz, Y., Hughes, S.M., 2018. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size. *Nat. Commun.* 9, 4232. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06583-6>
- Gerber, A.N., Klesert, T.R., Bergstrom, D.A., Tapscott, S.J., 1997. Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev.* 11, 436–450. <https://doi.org/10.1101/gad.11.4.436>
- Goodyear, L.J., 2008. The Exercise Pill — Too Good to Be True? *N. Engl. J. Med.* 359, 1842–1844. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0806723>
- Gutierrez-Salmean, G., Ciaraldi, T.P., Nogueira, L., Barboza, J., Taub, P.R., Hogan, M.C., Henry, R.R., Meaney, E., Villarreal, F., Ceballos, G., Ramirez-Sanchez, I., 2014. Effects of (–)epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* 25, 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.007>
- Guzmán Méndez, J.C., Marco Antonio, R.J., 2014. CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y PRÁCTICAS DEL USO DE FITOFÁRMACOS POR USUARIOS DEL INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MEDICINA ORIENTAL (IESMO), MANAGUA, EN EL MES DE NOVIEMBRE DEL AÑO 2013. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA.
- Hall, J.E., 2020. *Guyton and hall textbook of medical physiology*, 14th ed. Elsevier, Philadelphia.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., Klein, W.H., 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506. <https://doi.org/10.1038/364501a0>
- Hawley, J.A., Hargreaves, M., Joyner, M.J., Zierath, J.R., 2014. Integrative Biology of Exercise. *Cell* 159, 738–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.029>

- Henríquez-Olguín, C., Boronat, S., Cabello-Verrugio, C., Jaimovich, E., Hidalgo, E., Jensen, T.E., 2019. The Emerging Roles of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 2 in Skeletal Muscle Redox Signaling and Metabolism. *Antioxid. Redox Signal.* 31, 1371–1410. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7678>
- Hernández-Hernández, J.M., García-González, E.G., Brun, C.E., Rudnicki, M.A., 2017. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.010>
- Hervas Sotomayor, F., M. del Pino, E., 2017. Desarrollo neural, somitogénesis y morfología interna de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae). *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biológicas* 34, 99–102. <https://doi.org/10.26807/remcb.v34i1-2.238>
- Hollenberg, S.M., Cheng, P.F., Weintraub, H., 1993. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8028–8032. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8028>
- Holtzer, H., Marshall, J.M., Finck, H., 1957. AN ANALYSIS OF MYOGENESIS BY THE USE OF FLUORESCENT ANTIMYOSIN. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 705–724. <https://doi.org/10.1083/jcb.3.5.705>
- Hou, X., Snarski, P., Higashi, Y., Yoshida, T., Jurkevich, A., Delafontaine, P., Sukhanov, S., 2017. Nuclear complex of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and DNA repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease I protect smooth muscle cells against oxidant-induced cell death. *FASEB J.* 31, 3179–3192. <https://doi.org/10.1096/fj.201601082R>
- Huang, S.-C., Zhou, A., Nguyen, D.T., Zhang, H.S., Benz, E.J., 2016. Protein 4.1R Influences Myogenin Protein Stability and Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* 291, 25591–25607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.761296>
- Íñiguez Franco, F.M., 2011. ESTUDIOS DE LA DIFUSIÓN DE CATEQUINA Y EPICATEQUINA EN PELÍCULAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO Y SU CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- J, S., J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., n.d. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*.
- Jiménez Hernández, D.A., 2018. Efecto de la (-)-epicatequina sobre la liberación de miocinas en un modelo celular muscular. IPN.
- Jin, W., Peng, J., Jiang, S., 2016. The epigenetic regulation of embryonic myogenesis and adult muscle regeneration by histone methylation modification. *Biochem. Biophys. Rep.* 6, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.04.009>
- Kadi, F., Schjerling, P., Andersen, L.L., Charifi, N., Madsen, J.L., Christensen, L.R., Andersen, J.L., 2004. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles: Satellite cells, training and detraining. *J. Physiol.* 558, 1005–1012. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065904>
- Kim, J.A., Laney, C., Curry, J., Unguez, G.A., 2008. Expression of myogenic regulatory factors in the muscle-derived electric organ of *Sternopygus macrurus*. *J. Exp. Biol.* 211, 2172–2184. <https://doi.org/10.1242/jeb.016592>
- Kin Chan, S.S., 2013. What is a Master Regulator? *J. Stem Cell Res. Ther.* 03. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000e114>
- Kochi, T., Imai, Y., Takeda, A., Watanabe, Y., Mori, S., Tachi, M., Kodama, T., 2013. Characterization of the Arterial Anatomy of the Murine Hindlimb: Functional Role

- in the Design and Understanding of Ischemia Models. *PLoS ONE* 8, e84047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084047>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee, S.-J., Leem, Y.-E., Go, G.-Y., Choi, Y., Song, Y.J., Kim, I., Kim, D.Y., Kim, Y.K., Seo, D.-W., Kang, J.-S., Bae, G.-U., 2017. Epicatechin elicits MyoD-dependent myoblast differentiation and myogenic conversion of fibroblasts. *PLOS ONE* 12, e0175271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175271>
- Lora, V., Cerroni, L., Cota, C., 2018. Skin manifestations of rheumatoid arthritis. *Ital. J. Dermatol. Venereol.* 153. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.18.05872-8>
- Lujano, E., Manganiello, L., Contento, A., Ríos, Á., 2019. Identification and quantification of (+) - Catechins and Procyanidins in Cocoa from Ocumare de la Costa, Venezuela 10.
- Luo, W., Li, E., Nie, Q., Zhang, X., 2015. Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, Promotes Chicken Myoblast Fusion. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26186–26201. <https://doi.org/10.3390/ijms161125946>
- McLellan, T., 1982. Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal. Biochem.* 126, 94–99. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90113-0)
- Miller, K.B., Hurst, W.J., Flannigan, N., Ou, B., Lee, C.Y., Smith, N., Stuart, D.A., 2009. Survey of Commercially Available Chocolate- and Cocoa-Containing Products in the United States. 2. Comparison of Flavan-3-ol Content with Nonfat Cocoa Solids, Total Polyphenols, and Percent Cacao. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9169–9180. <https://doi.org/10.1021/jf901821x>
- Nabeshima, Yoko, Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., Nabeshima, Yo-ichi, 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532–535. <https://doi.org/10.1038/364532a0>
- Olson, E.N., 1990. MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* 4, 1454–1461. <https://doi.org/10.1101/gad.4.9.1454>
- Ornstein, L., 2006. DISC ELECTROPHORESIS-I BACKGROUND AND THEORY*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321–349. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x>
- Ortez, C., Benito, D.N.D., García, L.C., Expósito, J., Nolasco, G., Nascimento, A., 2019. AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA DE DUCHENNE 5.
- Papadopoulou, S., 2020. Sarcopenia: A Contemporary Health Problem among Older Adult Populations. *Nutrients* 12, 1293. <https://doi.org/10.3390/nu12051293>
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 457–465. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>
- Pérez, M. de L., Soriano, J., Ponce, E., Díaz, M., 2015. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review.* 9, 20.
- Peterson, D.L., Gleisner, J.M., Blakley, R.L., 1975. Bovine liver dihydrofolate reductase: purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* 14, 5261–5267. <https://doi.org/10.1021/bi00695a005>
- Petriz, B.A., Gomes, C.P.C., Almeida, J.A., de Oliveira, G.P., Ribeiro, F.M., Pereira, R.W., Franco, O.L., 2017. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle

- Proteome: MUSCLE PROTEOME IN RESPONSE TO EXERCISE TRAINING. *J. Cell. Physiol.* 232, 257–269. <https://doi.org/10.1002/jcp.25477>
- Porter, C., Reidy, P.T., Bhattarai, N., Sidossis, L.S., Rasmussen, B.B., 2015. Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 47, 1922–1931. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000605>
- Puri, P.L., Sartorelli, V., Yang, X.-J., Hamamori, Y., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Kedes, L., Wang, J.Y.J., Graessmann, A., Nakatani, Y., Levrero, M., 1997. Differential Roles of p300 and PCAF Acetyltransferases in Muscle Differentiation. *Mol. Cell* 1, 35–45. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80005-2)
- Ramirez-Sanchez, I., De los Santos, S., Gonzalez-Basurto, S., Canto, P., Mendoza-Lorenzo, P., Palma-Flores, C., Ceballos-Reyes, G., Villarreal, F., Zentella-Dehesa, A., Coral-Vazquez, R., 2014. (-)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic δ -sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J.* 281, 5567–5580. <https://doi.org/10.1111/febs.13098>
- Ramirez-Sanchez, I., Taub, P.R., Ciaraldi, T.P., Nogueira, L., Coe, T., Perkins, G., Hogan, M., Maisel, A.S., Henry, R.R., Ceballos, G., Villarreal, F., 2013. (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *Int. J. Cardiol.* 168, 3982–3990. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.089>
- Ramírez-Villafaña, M., Aceves-Aceves, J.A., Delgado-Nuño, J.E., Vizcaíno-Cortés, Z.G., Gómez-Ramírez, E.E., Castro-Jiménez, A., Enríquez-Luna, A., Gámez-Nava, J.I., González-López, L., n.d. Sarcopenia en artritis reumatoide 10.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., Buckingham, M., 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* 172, 91–102. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508044>
- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., Baylies, M.K., 2010. Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Dev. Biol.* 341, 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.024>
- Rojas, M., Smok, C., 2018. Modeling the Body of the Embryo during the Somitic Period. *Int. J. Med. Surg. Sci.* 1, 57–62. <https://doi.org/10.32457/ijmss.2014.009>
- Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E., Andersen, P., Jansson, E., 1977. FIBER TYPES AND METABOLIC POTENTIALS OF SKELETAL MUSCLES IN SEDENTARY MAN AND ENDURANCE RUNNERS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 301, 3–29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1977.tb38182.x>
- Sayah, A., English, J.C., 2005. Rheumatoid arthritis: A review of the cutaneous manifestations. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.023>
- Sengupta, S., Peterson, T.R., Sabatini, D.M., 2010. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol. Cell* 40, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.026>
- Snijders, T., Verdijk, L.B., Smeets, J.S.J., McKay, B.R., Senden, J.M.G., Hartgens, F., Parise, G., Greenhaff, P., van Loon, L.J.C., 2014. The skeletal muscle satellite cell response to a single bout of resistance-type exercise is delayed with aging in men. *AGE* 36, 9699. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9699-z>
- St. Andre, M., Johnson, M., Bansal, P.N., Wellen, J., Robertson, A., Opsahl, A., Burch, P.M., Bialek, P., Morris, C., Owens, J., 2017. A mouse anti-myostatin antibody increases muscle mass and improves muscle strength and contractility in the mdx mouse model

- of Duchenne muscular dystrophy and its humanized equivalent, domagrozumab (PF-06252616), increases muscle volume in cynomolgus monkeys. *Skelet. Muscle* 7, 25. <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0141-y>
- Steffl, M., Bohannon, R.W., Sontakova, L., Tufano, J.J., Shiells, K., Holmerova, I., 2017. Relationship between sarcopenia and physical activity in older people: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Interv. Aging* Volume 12, 835–845. <https://doi.org/10.2147/CIA.S132940>
- Tidball, J.G., Flores, I., Welc, S.S., Wehling-Henricks, M., Ochi, E., 2021. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis. *Exp. Gerontol.* 145, 111200. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111200>
- Tortora, G.J., Derrickson, B., 2021. *Principios de anatomía y fisiología*, 15^a ed. ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Velázquez, L.P.A., Aragón Martínez, M. del C., Cornejo Romero, A., n.d. Extracción y purificación de ADN.
- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N., Klein, W.H., 1995. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.* 128, 563–576. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.563>
- Wang, C., Yue, F., Kuang, S., 2017. Muscle Histology Characterization Using H&E Staining and Muscle Fiber Type Classification Using Immunofluorescence Staining. *BIO-Protoc.* 7. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2279>
- Wardle, F.C., 2019. Master control: transcriptional regulation of mammalian Myod. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 40, 211–226. <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09538-6>
- Yin, H., Price, F., Rudnicki, M.A., 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>

12. APENDICE Abreviaturas y siglas

ADN Ácido desoxirribonucleico	IUPAC Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
ATP Adenosín trifosfato. Nucleótido fundamental en la obtención de energía celular.	ME Musculo esquelético
bHLH Familia básica de hélice-bucle-hélice	MHC Cadena pesada de Miosina
BSA Seroalbúmina bovina	MM Masa molecular
CICUAL Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio	MPC Células precursoras miogénicas
CrI Grupo Control.	MRF Factor Regulador Miogénico
DM2 Diabetes mellitus tipo 2	Mrf4 Factor Regulador Miogénico 4
DMD Distrofia Muscular de Duchenne	MuSC Células satélites
DMSO Dimetilsulfóxido	Myf5 Factor Regulador Miogénico 5
Epi Epicatequina	MyoD Miogenina número 1
ETP Extracto total de Proteína	MyoG Miogenina
GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	NOM Norma oficial mexicana
GLUT4 Transportador de glucosa tipo 4	Pax 3 Proteína de caja emparejada Pax-3
H&E Hematoxilina y Eosina	Pax 7 Proteína de caja emparejada Pax-7
IBM SPSS Statistical Package for the Social Sciences (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales)	Q.A. Cuádriceps
INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía.	SDS Dodecil sulfato de sodio
	SDS-PAGE Dodecil sulfato de sodio poliacrilamida
	TBST Mezcla de solución salina tamponada con tris y polisorbato
	WB Western Blot

12.1. INDICE.

- A**
ADN, 11, 13
ATP, 5, 7
- B**
bHLH, 12
BSA, 27
- C**
CICUAL, 25
CrI, 24
- D**
DM2, 14, 16
DMD, 15, 21, 52
DMSO, 22, 24
- E**
Epi, 19, 24, 32, 33, 34, 35, 41, 43, 44
ETP, i, ii, 27, 35, 37, 38
- G**
GAPDH, 30, 40, 41, 42
GLUT4, 17
- H**
H&E, ii, 22, 31, 32, 34, 43
- I**
IBM SPSS, 33
INEGI, 21
- IUPAC**, 18
- M**
ME, 3, 21, 26
MHC, 20
MM, 40
MRF, i, 9, 11, 12, 13, 17
MuSC, 10
Myf5, 9, 10, 11, 12
MyoD, ii, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 20, 22, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48
MyoG, ii, 9, 11, 13, 17, 22, 30, 40, 41, 42, 43, 44
- N**
NOM, 25
- P**
Pax, 9, 10
- Q**
Q.A., 24, 26, 34
- S**
SDS, 28, 29, 37, 38, 48
SDS-PAGE, 29, 38
- T**
TBST, 30, 31
- W**
WB, 4

13. APÉNDICE I

Artritis Reumatoide: Enfermedad reumática crónica que se caracteriza por la afectación de las articulaciones periféricas (manos, pies, muñecas, hombros, codos, caderas y rodillas). En las que se produce dolor, hinchazón secundaria a la inflamación de la membrana sinovial y rigidez sobre todo por la mañana o después de periodos prolongados de reposo; además de dañar las articulaciones y los tejidos circundantes (tendones y músculos), puede provocar una disminución de la movilidad y de la función articular, la inflamación crónica puede afectar a otros órganos como el corazón, el pulmón o el riñón.(Lora et al., 2018; Sayah and English, 2005)

Atrofia: Desgaste (adelgazamiento) o pérdida del tejido muscular.

Caquexia: Estado de extrema desnutrición, atrofia muscular, fatiga y debilidad.

Caquexia reumatoidea: Es una enfermedad crónico-degenerativa y autoinmune que se caracteriza clínicamente por un estado de inflamación crónica de las articulaciones sinoviales, dolor, anquilosis y deformaciones que ocasiona diferentes grados de discapacidad física.(Ramírez-Villafaña et al., n.d.)

Catequinas: Antioxidante polifenólico que procede de las plantas en las cuales aparece como un metabolito secundario; procedentes de la familia de los flavonoides.

Criostato: Dispositivos utilizados para realizar cortes histológicos de tejidos congelados.

Degenerativo: Enfermedad en la cual la función o la estructura de los tejidos u órganos afectados empeoran con el transcurso del tiempo.

Dermomiotomas: Subdivisión (diferenciación) de la parte dorsal de los somitas, que tiene lugar durante la embriogénesis.

Diferenciación: Proceso por el que las células adquieren una forma y una función determinada durante el desarrollo embrionario o la vida de un organismo pluricelular, especializándose en un tipo celular.

Distrofia Muscular de Duchenne: Enfermedad determinada genéticamente, ligada al cromosoma X, caracterizada clínicamente al producir debilidad muscular progresiva, con una

incidencia de 1 por cada 3500-6000 varones nacidos. Está causada por la mutación del gen DMD, que codifica la distrofina, una proteína subsarcolemal esencial para la estabilidad muscular estructural.(Ortez et al., 2019)

Espondilitis Anquilosante: Tipo de artritis que afecta principalmente a la columna vertebral.("Espondilitis anquilosante," 1994)

Fibrosis: Sustitución del tejido muscular por tejido fibroso o acumulación de fibras de colágeno.

Fitofármacos: La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a los fitofármacos como productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico.(Guzmán Méndez and Marco Antonio, 2014)

Flavonol: Compuestos de bajo peso molecular que constan de 15 átomos de carbono con una configuración de C6-C3-C6. Esencialmente, su estructura consta de dos anillos aromáticos A y B, unidos por un puente de tres carbonos, por lo general en forma de un anillo heterocíclico C.(Iñiguez Franco, 2011; Lujano et al., 2019)

Hipertrofia: Nombre científico dado al fenómeno de crecimiento en el tamaño de las células, en este trabajo es referente a las células musculares.

Homeostasis: Estado de equilibrio entre todos los sistemas del cuerpo que se necesitan para funcionar correctamente.

In vitro: (Latín: dentro del vidrio) se refiere a una técnica realizada en un tubo de ensayo, o, generalmente, en un ambiente controlado fuera un organismo vivo.

In vivo: (Latín: dentro de lo vivo), Referente a experimentar dentro o en el tejido vivo de un organismo; es decir que, ocurre o tiene lugar dentro de un organismo vivo.

Locomoción: Actividad que permite moverse de un lugar a otro.

Lupus Eritematoso Sistémico: Enfermedad autoinmune de curso crónico, de causa desconocida y tiene numerosas manifestaciones clínicas y multisistémicas debido a la producción de autoanticuerpos contra autoantígenos y a la formación de múltiples

inmunocomplejos que median respuestas inflamatorias al depositarse en diversos órganos y tejidos.(Clara et al., 2017)

Mioblasto: Célula indiferenciada con capacidad para sintetizar filamentos finos poco antes de su proceso de fusión con otros mioblastos y dar lugar a la formación de miotubos.

Miofibras: Estructura contráctil que se encuentra dentro del citoplasma de los miocitos del tejido muscular y les da la propiedad de contracción y de elasticidad, la cual permite realizar los movimientos característicos del músculo.

Miogénesis: Formación de tejido muscular esquelético, particularmente durante el desarrollo embrionario.

Miotomas: Conjunto de músculos inervados por una raíz nerviosa.

Mononucleado: Una sola masa celular con muchos núcleos sin separación física entre ellos.

Myomaker: Es una proteína de membrana específica del músculo necesaria para la fusión de mioblastos embrionarios.

Patología: Rama de la medicina y la biología encargada del estudio de las enfermedades.

Polimerizar: Proceso químico por el que los reactivos, monómeros se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de gran peso, llamada polímero, o bien una cadena lineal o una macromolécula tridimensional.

Proliferación: Proceso por el cual una célula crece y se divide para producir dos células hijas.

Regeneración: Proceso por el que se recupera la estructura y la función de órganos o partes del cuerpo dañados.

Sarcopenia: Enfermedad geriátrica progresiva y generalizada del músculo esquelético, caracterizada por una disminución de la fuerza muscular, de la masa muscular y finalmente del rendimiento físico; constituye un problema de salud creciente, a menudo no diagnosticado.(Papadopoulou, 2020)

Somita: Estructura segmentada, formada a ambos lados del tubo neural durante el desarrollo embrionario a partir del mesodermo paraxial o mesodermo dorsal somítico; posee un rol importante en la organización del patrón segmentario en los embriones de los vertebrados, dando origen a las células que formarán las vértebras y costillas, la dermis de la piel dorsal, los músculos esqueléticos de la espalda y los músculos esqueléticos de la pared corporal y de las extremidades.(Rojas and Smok, 2018)

Somitogenesis: Proceso por el cual se forman las somitas a partir del mesodermo paraxial localizado a cada lado de la línea media del cuerpo.(Hervas Sotomayor and M. del Pino, 2017)

Western Blot: Técnica de laboratorio utilizado para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido; implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra, las cuales se separan y se transfieren del gel a la superficie de una membrana, la cual se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio. Esta unión detecta usando un marcador radiactivo o químico.



LA SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

a través de la Dirección de Investigación
otorga la presente:

CONSTANCIA

a: **Anya Ayelen Valdez Hernandez, Paola B. Zárate-Segura, José Manuel Hernández-Hernández, Sergio de los Santos, Andrea S. Tejeda-Gómez , Luis Javier Cano-Martínez, Patricia Canto, Ramón M. Coral-Vázquez , Carlos Palma-Flores.**

por su participación en la modalidad: Cartel PDF con el Trabajo:

"(-)-Epicatequina incrementa en músculo esquelético la expresión de microRNAs implicados en la respuesta al ejercicio."

como parte de las actividades del **XVII Foro PIFI 2022**,
realizadas de manera virtual los días
17, 18, 19 y 20 de octubre de 2022.

Ciudad de México, a 21 de octubre de 2022.

"La Técnica al Servicio de la Patria"



DRA. TANIA LIBERTAD JACOBO ESTRADA
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

(-)-Epicatechin modulates the expression of myomiRs implicated in exercise response in mouse skeletal muscle

Carlos Palma-Flores^a, Paola B. Zárate-Segura^b, J. Manuel Hernández-Hernández^c, Sergio de los Santos^d, Andrea S. Tejeda-Gómez^e, Luis Javier Cano-Martínez^f, Patricia Canto^d, Jorge Omar García-Rebollar^g, Ramón M. Coral-Vázquez^{e,f,*}

^a Catedrático CONACYT, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^b Laboratorio de Medicina Traslacional, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^c Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

^d Unidad de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

^e Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Mexico City, Mexico

^f Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^g Unidad de Modelos Biológicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico



ARTICLE INFO

Edited by Andre van Wijnen

Keywords:

(-)-epicatechin
Skeletal Muscle
myomiRs
MyoD
Myogenin
Hypertrophy

ABSTRACT

The flavanol (-)-epicatechin has exercise-mimetic properties. Besides, several miRNAs play a role in modulating the adaptation of the muscle to different training protocols. However, notwithstanding all information, few studies aimed to determine if (-)-epicatechin can modify the expression of miRNAs related to skeletal muscle development and regeneration.

Mice were treated for fifteen days by oral gavage with the flavanol (-)-epicatechin. After treatment, the quadriceps of the mice was dissected, and total RNA was extracted. The expression level of miR-133, -204, -206, -223, -486, and -491 was analyzed by qRT-PCR. We also used bioinformatic analysis to predict the participation of these miRNAs in different skeletal muscle signal transduction pathways. Additionally, we analyzed the level of the myogenic proteins MyoD and myogenin by Western blot and measured the cross-sectional area of muscle fibers stained with E&H.

(-)-Epicatechin upregulated the expression of miR-133, -204, -206, -223, and -491 significantly, which was associated with an increase in the level of the myogenic proteins MyoD and Myogenin and an augment in the fiber size. The bioinformatics analysis showed that the studied miRNAs might participate in different signal transduction pathways related to muscle development and adaptation.

Our results showed that (-)-epicatechin upregulated miRNAs that participate in skeletal exercise muscle adaptation, induced muscle hypertrophy, and increased the level of myogenic proteins MyoD and MyoG.

1. Introduction

Among the benefits of exercising regularly are systemic effects on cardiac function, vascular system, energetics, and intrinsic impact on

skeletal muscle (SkM), such as increased muscle mitochondrial density and myofiber hypertrophy. These changes are mediated by transcriptional networks involving numerous regulators and signaling pathways (Hoffman, 2017; Phillips et al., 2013).

Abbreviations: miRNA, micro RNA; miR-, micro RNA; E&H, Hematoxylin & Eosin; qRT-PCR, Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR; MyoG, Myogenin; myomiRs, Muscle-specific microRNAs; Skeletal muscle, SkM; IGF-1, Factor de crecimiento insulinoide 1; mTORC1, Mammalian target of rapamycin complex 1; MRF, Myogenic regulatory factors; Epi, (-)-Epicatechin; cDNA, Complementary DNA; RNA, Ribonucleic acid; RIPA, Radioimmunoprecipitation assay buffer; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TBS-T, Tris-buffered saline with Tween® 20; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; BSA, bovine serum albumin.

* Corresponding author at: Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: rcoral@ipn.mx (R.M. Coral-Vázquez).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146907>

Received 16 May 2022; Received in revised form 1 September 2022; Accepted 19 September 2022

Available online 26 September 2022

0378-1119/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

MicroRNAs (miRNAs), a class of non-coding RNAs, play an important role in regulating gene expression. Over the past years, multiple reports have addressed the effect of physical exercise on the expression of miRNAs (Silva et al., 2020). Myogenic microRNAs, termed myomiRs, a class of miRNAs expressed in cardiac and SkM, have been identified as essential determinants in muscle development and regeneration (Ge and Chen, 2011; Horak et al., 2016). It has been proposed that the myogenic regulatory factors (MRFs) MyoD and myogenin, and transcription factors involved in mediating muscle stem cell function, such as Pax7 and Pax3, may be regulated by myomiRNAs (Li et al., 2016; Rao et al., 2006). Besides, it has been reported that several myomiRs are regulated due to acute resistance training and endurance exercise in human and mouse skeletal muscle (Nielsen et al., 2010).

For instance, it has been shown that after resistance training, miR-206 expression was sevenfold higher in the soleus of the mouse. However, after overload, the expression of miR-1 and miR-133a dramatically decreased, whereas miR-206 was unchanged. Similar downregulation of miR-1 was reported in muscle biopsies from men after resistance training (Drummond et al., 2008b). The decrease in miR-1 level was accompanied by an increase in IGF-1 expression and activation of the mTORC1 pathway, implicated in the activation of synthesis of proteins and muscle mass (Mueller et al., 2011). Furthermore, downregulation of miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a-5p, and miR-499 was shown to be caused by acute resistance exercise or strength-endurance training (Pyfe et al., 2016; Margolis et al., 2017; Rivas et al., 2014). Animal studies have shown that downregulation of miR-1 and miR-206 substantially enhances satellite cell proliferation (Chen et al., 2010). These data are consistent with the results showing that human resistance training leads to increased muscle protein synthesis and intensive satellite cell proliferation 1–4 days after exercise (Cramer et al., 2004; Dreyer et al., 2006; Drummond et al., 2008a). Next, downregulation of miR-1, miR-133, miR-206, and miR-499 is associated with muscle hypertrophy (Carè et al., 2007; Margolis et al., 2017).

(-)-Epicatechin (Epi), a naturally abundant compound in Theobroma cacao beans (de la Luz Cadis-Gurrea et al., 2019), has beneficial effects on cardiac and SkM. Some studies have shown that Epi can lessen the adverse effects of reperfusion injury in myocardial ischemia, myocardial infarct, and dilated cardiomyopathy (De Los Santos et al., 2018; Yamazaki et al., 2008). In SkM, Epi actions are related to a significantly increased survival rate of normal aged mice (Moreno-Ulloa et al., 2015; Si et al., 2019), improvement of the mitochondria-related protein levels, and the reduction of oxidative stress in a dystrophic mouse model (Ramirez-Sanchez et al., 2014). In Becher muscular dystrophy patients, these actions have been associated with the induction of mitochondrial biogenesis and muscle regeneration markers. Likewise, Epi has been proposed as an exercise mimetic since it enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscles (Nogueira et al., 2011).

Based on this knowledge and the mimetic exercise properties of Epi, we aimed to evaluate the effect of this flavonol on the level of expression of myomiRs -133, -204, -206, -223, -406, and -491 and its association with the protein level of the MRF MyoD and Myogenin.

2. Material and methods

2.1. Animal experiments

The Ethics Code approved the animal experiment of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and the U.S. Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources authorized in Mexico by the National Academy of Medicine in agreement with the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. Additionally, we obtained the approval of the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (No. CIOUAL-04/15-08-2014) of the School of Medicine from the National Polytechnic Institute of Mexico. We used twelve CD-1 mice randomly distributed in two groups: water-treated (Control, Ctrl) and Epi-treated (Epi). The

treatment was based on a previous study that reported Epi's beneficial effects on muscle tissues (Gutierrez-Salmeán et al., 2014; Ramirez-Sanchez et al., 2014). Beginning at the age of 2.5 months old, mice were provided with either vehicle (water) or 1 mg/kg body mass of Epi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) by oral gavage twice daily (morning and evening) for two weeks. After treatment, mice were euthanized using ketamine and xylazine sedation followed by cervical dislocation. Then skeletal muscle (*quadriceps*) was excised and immediately stored at -80°C until further analysis.

2.2. Total RNA extraction

For qRT-PCR analysis, total RNA was isolated from 100 mg of skeletal muscle tissue using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagent according to the manufacturer's protocol. The RNA obtained was treated at room temperature for 15 min with 10U of DNase I (Roche, Indianapolis, IN, USA), and the nucleases were inactivated at 80°C for 20 min. RNA was precipitated at -20°C for 20 min after adding 2.5 volumes of ethanol and 1/10 volumes of sodium acetate 3 M. Finally, RNA concentration and purity were assessed by U.V. spectrophotometry with Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After RNA isolation, all samples were immediately frozen and stored at -80°C .

2.3. qRT-PCR analyses of miRNAs

To quantify miRNAs, cDNA was synthesized from 100 ng of total RNA and 3.0 μL of R.T. primer provided by different Assay (Applied Biosystem), using the AgPath-ID One-step enzyme R.T. protocol from Applied Biosystem, cDNA reactions were carried out by 1 cycle at 16°C for 30 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. The resulting cDNA was amplified by taking 2 μL mixed with 10 μL of Universal Fast Mix (Applied Biosystems) plus 0.5 μL of TaqMan MicroRNA Assays primers (Life Technologies) and adjusted at 20 μL . Finally, real-time PCR reactions were performed in the LightCycler 96 instrument at 50°C for 120 s, 95°C for 20 s, 45 cycles of 95°C for 10 s, and 60°C for 30 s (Roche, Indianapolis, IN). All reactions were run in triplicate, and the average threshold cycle and S.D. values were calculated. For the study, we analyzed the expression of microRNAs (miR): mmu-miR-206 (Assay ID: 0005110), mmu-miR-133 (Assay ID: 001637), mmu-miR-406 (Assay:001278), mmu-miR-204 (Assay ID: 0005008), mmu-miR-223 (Assay:002090) and mmu-miR-491 (Assay ID 001630) by using TaqMan Advanced MicroRNA Assays from Applied Biosystem. All samples were normalized to internal control, and fold changes were calculated through relative quantification. We selected U6-mRNA (Assay ID:001973) TaqMan assay based on its historical use for Northern Blot normalization. Besides that, U6 had comparable reproducibility and performance to the miRNA Taqman assays (Corney et al., 2007; Shell et al., 2007).

2.4. Histology

After dissection of SkM specimens, the tissue was embedded with a minimum amount of Tissue-Tek and subsequently frozen by placing it into cooled 2-methylbutane for 5 min and then stored at -80°C until processing. For evaluation of muscle morphology, 10 μm thick serial cross-sections were obtained by using a pre-cooled cryostat at -20°C . Later, the cryosections were subjected to hematoxylin and eosin (H&E) staining, as Wang et al. (Wang et al., 2017). Finally, the quantitative analysis was determined by measuring the cross-sectional area (CSA) using AxioVision software (Zeiss) 1200 fibers.

2.5. Western blot

For Western blot analysis, approximately 50 mg of skeletal muscle were homogenized with a hand-held homogenizer in 500 μL of RIPA

buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (A32961 Pierce™, Thermo scientific). Then, homogenates were sonicated 5 min 3 times at 4 °C and centrifuged at 12,000 g for 20 min. Total protein content was measured in the supernatant using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, USA). A total of 40 µg of protein was loaded onto 2 % to 12 % SDS-PAGE gradient, electrotransferred, and incubated for 1 h in blocking solution (5 % non-fat dry milk in TBS plus 0.1 % Tween 20 [TBS-T]) followed by overnight incubation at 4 °C with appropriate primary antibody. We use MyoD (MYOD) monoclonal antibody 5.6A (MA5-12902) and Myogenin (MYOG) monoclonal antibody P5D (MA5-11486) from ThermoFisher scientific, and as a loading control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody 14C10 (2118) from Cell Signalling. All primary antibodies were diluted 1:1000–2000 in TBS-T plus 5 % bovine serum albumin (BSA) (Rockland, USA). Membranes were washed four times for 5 min in TBS-T and incubated for 1 h at room temperature in the presence of a specific HRP-conjugated secondary antibody in the blocking solution. Membranes were re-washed four times in TBS-T, and the immunoblots were finally developed using a Plus-ECL chemiluminescence detection kit (Thermo-Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA).

2.6. myomiRNAs bioinformatics analysis

Skeletal muscle-specific expression genes and pathways were downloaded from the D.B. muscle database (<http://muscledb.org/>). mirDIP was used for the bidirectional analysis of myomiRNAs targets expressed in SkM with at least three positive prediction filters (http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index_confirm.jsp#r). To determine the routes and biological processes and predict interactions in which the myomiRNAs regulate the targets, including the miRNAs studied experimentally, we used ShinyGO v0.75 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>).

2.7. Statistical analysis

All experiments included at least three biological replicates. For the miRNA study, RT-PCR data were analyzed via $-2^{\Delta\Delta CT}$ and expressed as means \pm standard error of the mean (SEM), as refers Mestdagh et al. (Mestdagh et al., 2009) and Benes and Castoldi, (Benes and Castoldi, 2010). Two-tailed Student's *t*-test determined significant differences between the control and the treated group. $P < 0.05$ indicated a statistically significant difference.

3. Results

3.1. Skeletal muscle genes potentially regulated by myomiRNAs

myomiRNAs could regulate distinct muscle-specific expression genes and Pathways (Table 1), and their expression can be affected by different types of exercise (Zacharewicz et al., 2013). An initial bioinformatic analysis (Fig. 1A) showed that myomiRNAs might regulate at least 529 skeletal muscle genes. These genes are involved in different cellular processes (Fig. 1B) and molecular functions (Fig. 1C). In the ontology of cellular process, the pathways with more targeted genes were cellular protein metabolic process, macromolecule modification, cellular protein modification process, and protein modification process. Concerning the ontology of the molecular function, the pathways with more targeted genes were catalytic activity acting on a protein, enzyme binding, hydrolase activity, and RNA binding.

3.2. (-)-Epicatechin modified the level expression of myomiRNAs

Since the flavanol Epi has exercise-like effects (Guerrero et al., 2017), we decided to evaluate if this molecule could modify the expression level of the myomiRNAs-133, -204, -206, -223, -406, and -491 in SkM. In Fig. 2 (Panel A), the qRT-PCR analysis showed that quadriceps muscle

Table 1
Skeletal muscle-specific expression genes and Pathways regulated by myomiRNAs.

Pathway	No Genes	Genes
CAMP catabolic process	2	Pde4d Pde7a
Cellular response to parathyroid hormone stimulus	2	Mef2c Hdac
Striated muscle adaptation	3	Mef2c Tuni1 Foxo1
Positive regulation of RNA splicing	3	Khdbs3 Rbm20 Thrsp3
Response to dexamethasone	3	Gdnf Foxo1 Foxo3
Regulation of alternative mRNA splicing via spliceosome	3	Khdbs3 Mbnl1 Thrsp3
Myotube differentiation	4	Dyrk1b Mef2c Hdac4 Stim1
Cardiac muscle contraction	4	Pde4d Bin1 Hdac4 Tuni1
Regulation of muscle adaptation	5	Mef2c Hdac4 Tuni1 Foxo1 Foxo3
Muscle adaptation	5	Mef2c Hdac4 Tuni1 Foxo1 Foxo3
Cellular response to steroid hormone stimulus	5	Gdnf Ube3a Padf2 Foxo1 Foxo3
Skeletal muscle tissue development	6	Mef2c Hdac4 Cops2 Mbnl1 Cfl2 Zbtb18
Skeletal muscle organ development	6	Mef2c Hdac4 Cops2 Mbnl1 Cfl2 Zbtb18
Muscle contraction	6	Pde4d Gdnf Bin1 Hdac4 Tuni1 Tpm3
Cellular carbohydrate metabolic process	6	Dusp3 Mef2c Bin1 Pfa2 Padf2 Foxo3
Negative regulation of cellular component movement	6	Mef2c Pde4d Bin1 Hdac4 Tuni1 Foxo1 Foxo3
Muscle organ development	7	Mef2c Hdac4 Tuni1 Cops2 Mbnl1 Cfl2 Zbtb18
Striated muscle tissue development	7	Mef2c Hdac4 Tuni1 Cops2 Mbnl1 Cfl2 Zbtb18
Autophagy	7	Nbr1 Rb1cc1 Arl8b Map1lc3b Foxo1 Foxo3 Usp13
Muscle tissue development	7	Mef2c Hdac4 Tuni1 Cops2 Mbnl1 Cfl2 Zbtb18
Process utilizing autophagic mechanism	7	Nbr1 Rb1cc1 Arl8b Map1lc3b Foxo1 Foxo3 Usp13
Muscle system process	7	Mef2c Pde4d Gdnf Bin1 Hdac4 Tuni1 Tpm3 Foxo1 Foxo3
Cellular response to lipid	9	Mef2c Pde4d Gdnf Ube3a Padf2 Foxo1 Foxo3 Mn1 Zfp703
Cellular response to organic cyclic compound	9	Mef2c Pde4d Gdnf Ube3a Padf2 Foxo1 Foxo3 Mn1 Zfp703
Muscle structure development	9	Dyrk1b Mef2c Bin1 Hdac4 Tuni1 Cops2 Mbnl1 Stim1 Cfl2 Zbtb18
Response to lipid	10	Mef2c Pde4d Gdnf Igf2r Ube3a Padf2 Foxo1 Foxo3 Mn1 Zfp703
Cellular catabolic process	10	Usp32 Nbr1 Pde4d Gdnf Ube3a Rb1cc1 Arl8b Map1lc3b Pla2g15 Cpeb3 Thrsp3 Foxo1 Foxo3 Usp13 Pde7a
Catabolic process	15	Usp32 Nbr1 Pde4d Gdnf Ube3a Rb1cc1 Hdac4 Arl8b Map1lc3b Pla2g15 Cpeb3 Thrsp3 Foxo1 Foxo3 Usp13 Pde7a
Animal organ development	16	Dyrk1b Mef2c Nbr1 Gdnf Igf2r Ube3a Rb1cc1 Hdac4 Tuni1 Cops2 Mbnl1 Stim1 Wdr62 Plc2 Sdk40 Rbm20 Foxo1 Foxo3 Cfl2 Zbtb18 Zfp703

Skeletal muscle-specific expression genes and pathways were downloaded from the D.B. Muscle database, <http://muscledb.org/>.

presented a significant increase in the expression level of miRNAs-133, -204, -206, -223, and -491 in the mice treated with (-)-epicatechin for 15 days, but not in miRNA 406. Then, a bioinformatic evaluation (Fig. 2B) showed that the studied miRNAs regulate a network of interactions of different pathways of biological processes. Interestingly, muscle adaptation and its regulation, muscle structure development, and regulation of muscle contraction stand out within these processes.

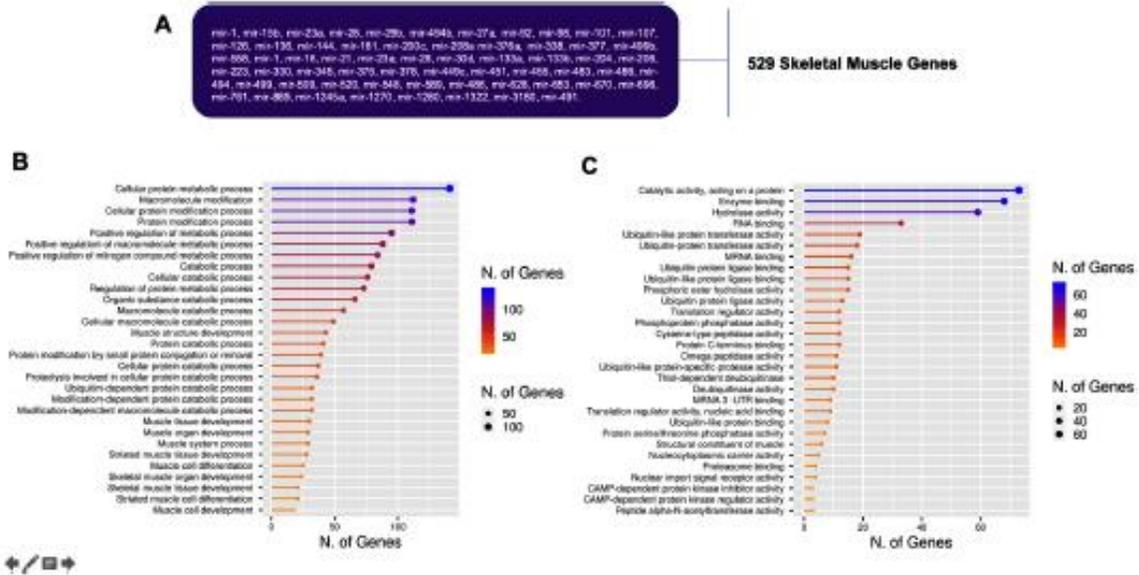


Fig. 1. myomiRNAs that regulate skeletal muscle genes. A. Purple box shows 529 predicted muscle-specific targets genes of myomiRs. B. Ontology of the cellular process where all target genes are involved in skeletal Muscle. C. Ontology of molecular functions where all target genes are involved in skeletal Muscle. Bioinformatic analysis was carried out with http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index_confirm.jsp#r. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

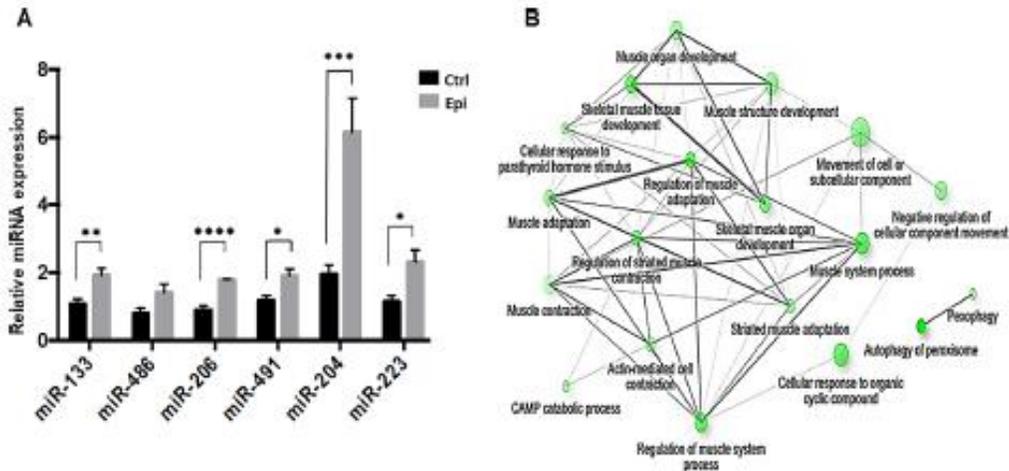


Fig. 2. Relative myomiRNAs expression in skeletal quadriceps muscle of mice treated for 15 days with (-)epicatechin. A. RT-qPCR analysis shows that miR-133, -206, -491, -204, and -223 significantly increase in (-)Epicatechin treated mice. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. Bar graphs show myomiRNAs/U6-sRNA relative expression. The results are presented as mean \pm SD, *n* = 6, **p* = 0.012, ***p* = 0.005, ****p* = 0.0024, *****p* = 0.000166 vs Ctrl. Ctrl: Vehicle (DMSO) treated group; Epi: (-)epicatechin treated group. B. Pathway interaction network of biological processes regulated by miR-133, -206, -491, -204, and -223. Images depict the interaction of different skeletal muscle processes regulated by the analyzed miRNAs. Bioinformatic analysis was carried out with <http://bioinformatics.sjstate.edu/go/>.

3.3. (-)Epicatechin increase the SkM fiber size

Given that resistance exercise induces muscular hypertrophy in humans and animals (Wackerhage et al., 2019), we decided to evaluate if Epi was able to modify the fiber size. Fig. 3 shows a statistically significant (*p* = 0.0031) increment in the transversal area of the skeletal muscle fibers of mice supplied with the flavonol.

3.4. (-)Epicatechin increase the level of MyoD and myogenin

MyoD and myogenin are relevant regulators of adult muscle growth (Ganani et al., 2020; Legerlotz and Smith, 2008); consequently, we evaluated the protein level of these transcription factors in the mice treated with Epi. The flavonol induced a significant increment of MyoD (*p* = 0.0028) and myogenin (*p* = 0.0031) in the skeletal muscle fibers of treated mice (Fig. 4).

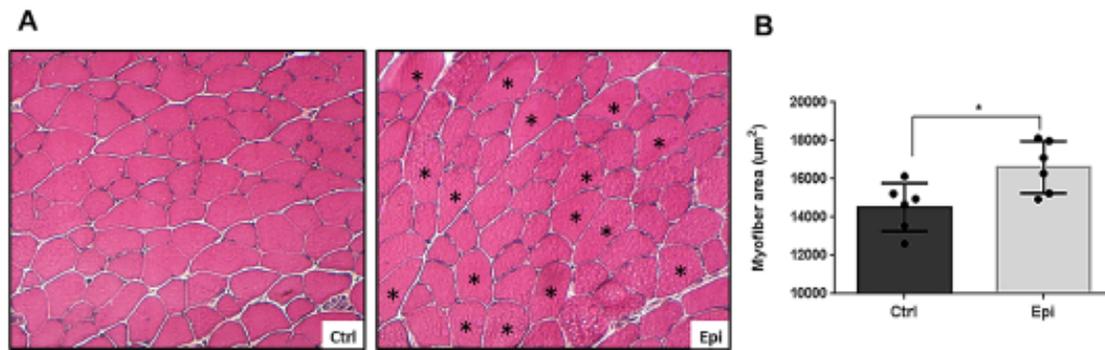


Fig. 3. The protein level of MyoD and MyoG. Western blot analysis showed a significant increment in the protein level of MyoD ($*p = 0.0028$ vs Ctrl) and myogenin ($*p = 0.0031$ vs Ctrl) in the (-)-epicatechin treated mice. Bar graphs show densitometry analysis of protein/GAPDH. $n = 6$ animals. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

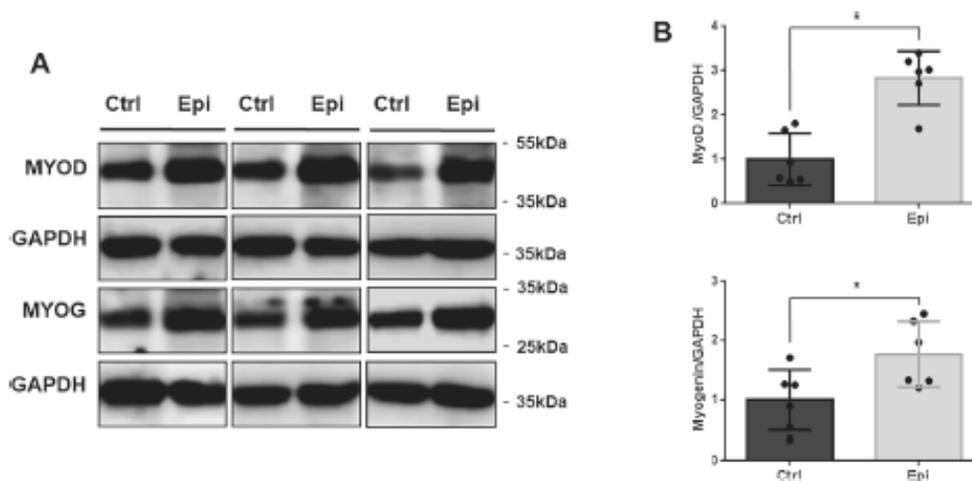


Fig. 4. Comparison of skeletal muscle cross-sectional area among Ctrl and (-)-epicatechin treated mice. A. The area size of the fibers was evaluated on H&E stained cross sections. * Indicates fibers with the largest area. B. The area's histogram shows the cells' distribution in Ctrl (black bars) and Epi group (gray bars). Comparison data are plotted as mean \pm SEM. Note the significant increase of the area size in the fibers of Epi-treated mice. $*p = 0.019$ vs Ctrl group by Student's *t*-test, $n = 1200$.

4. Discussion

The present study reports that Epi increased the expression level of several myomiRs that regulate different pathways during the adaptation of SkM to physical exercise. Besides, this upregulation correlates with the increase in the myogenic proteins MyoD and myogenin levels and the hypertrophy of the SkM fibers. It is known that physical activity induces changes in distinct regulatory pathways of SkM, including changes in mitochondrial biogenesis and metabolism, augmented muscle vascularization, and the adjustment of myofibrillar content (Petris et al., 2017; Porter et al., 2015). Studies by our group and others have shown that Epi also induces mitochondrial biogenesis, increases the antioxidant protein level and their activity, and favorably impacts multiple molecular regulatory mechanisms of the SkM (Munguia et al., 2022; Ramirez-Sanchez et al., 2014). Given these characteristics, this flavanol has been classified as an exercise-mimetic (Guerrieri et al., 2017).

Recently it has been observed that physical exercise can modify the expression of several miRNAs in SkM (Davidsen et al., 2011; Kirby and McCarthy, 2013). In this study, we observed that Epi significantly upregulated the expression of miR-206, miR-133, miR-204, miR-223,

and miR-491. The miRs with higher significant increase was miR-206 ($p < 0.000166$), miR-204 ($p < 0.0024$), miR-133 ($p < 0.005$). A study has reported downregulation of miR-206 and miR-133a/b in the human vastus lateralis after short-term high-intensity endurance training (Nielsen et al., 2010). Another study showed downregulation of miR-206 after endurance overload training but upregulation with cycle ergometry endurance exercise (Margolis et al., 2017). A possible explanation for the upregulation of miR-206 observed with Epi is that this flavanol mimics a specific type of exercise. It is also important to consider the muscle type used in the different assays tests since the effects of both exercise and the flavanol may differ depending on the composition of fiber type (Lee et al., 2022). Concerning miR-204, there are no studies that analyze this miRNA in SkM. Still, one study reported no effect on bone marrow when using exercise training at different intensities (Farvati et al., 2019). Regarding miR-223, one-hour acute exercise increases the level of miR-223 in the individuals' plasma. miR-223 may be a component of the SkM-specific circulating miRNAs that respond to exercise (Nielsen et al., 2014).

Our bioinformatic analysis showed that the myomiRs -133, -206, -491, -204, and -223 could participate in regulating different pathways and their involved genes, such as muscle adaptation and its regulation,

skeletal muscle tissue development, regulation of striated muscle contraction, and so on. For example, a study found that miR-491 was a negative regulator of myogenic differentiation targeting myomaker (He et al., 2017), and miR-133 participated in early myogenesis, modulating the Shh signaling pathway by targeting *Olig3* (Mok et al., 2018). Another study proposed that miR-206 played a relevant role in satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration and slowed Duchenne muscular dystrophy's progression (Liu et al., 2012). About the miR-204 Houselle et al. (Houselle et al., 2020) found that it modulated mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes and associated with human oxidative capacity. On the other hand, the miR-223-3p can participate in skeletal muscle regeneration by controlling the balance of pro- and anti-inflammatory factors in the skeletal muscle microenvironment (Cheng et al., 2020). All these studies highlight the importance of these miRNAs in the regeneration, adaptation, and repair of the SkM.

One of the main consequences of physical exercise is hypertrophy, and it has been proposed that myomiRNAs expression regulation may influence this phenomenon (Ultimo et al., 2018). Our data showed that Epi induced a significant growth of the SkM. However, inconsistent with our results, other authors have found downregulation of miR-1 and miR-133a in hypertrophy SkM (McCarthy and Easer, 2007).

On the other hand, some studies have reported that myomiRNAs are regulated by myogenic regulatory factors (MRFs), including MyoD and MyoG (Rao et al., 2006; Roosenberg et al., 2006). Consistent with this, the level of these two MRFs increased in the SkM of the mice treated with (-)-epicatechin.

In summary, our study provides evidence that (-)-epicatechin can induce miRNA upregulation in the mouse quadriceps muscle, a tissue with abundant fast-twitch fibers. This regulation was associated with the level increase of the myogenic transcription factors MyoD and myogenin and the hypertrophy of the SkM fibers. However, a study limitation is that we analyzed only one skeletal muscle with a predominance of fast-twitch fibers. Future research should explore the effect of (-)-epicatechin on muscles with different metabolic characteristics under normal and pathological conditions. Consequently, our research group has an ongoing investigation analyzing non-coding RNAs and proteins involved in skeletal muscle repair and growth and response to exercise in normal and pathological conditions.

Funding

This publication was made possible by grants from CONACYT (140637), Mexico and SIP-IPN (2085) to PBZS and RMCV.

CRedit authorship contribution statement

Carlos Palma-Flores: Formal analysis, Methodology. Paola B. Zárate-Segura: Formal analysis, Methodology. J. Manuel Hernández-Hernández: Formal analysis, Writing – original draft. Sergio de los Santos: Methodology. Andrea S. Tejeda-Gómez: Formal analysis. Luis Javier Cano-Martínez: Methodology, Formal analysis. Patricia Cantos: Methodology, Writing – original draft. Jorge Omar García-Rebollán: Methodology. Ramón M. Coral-Vázquez: Conceptualization, Data curation, Writing – original draft, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgement

We would like to thank Mónica Martínez Marcial for the support in the maintenance of the mouse colony.

References

- Benes, V., Castoldi, M., 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50 (4), 244–249.
- Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, P., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.-L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V.G., Højdal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dora, G.W., Ellingsen, Ø., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C., Condorelli, G., 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 13 (5), 613–618.
- Chen, J.F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., Wang, D.Z., 2010. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* 190, 867–879.
- Cheng, N., Liu, C., Li, Y., Gao, S., Han, Y.-C., Wang, X., Du, J., Zhang, C., 2020. MicroRNA-223-3p promotes skeletal muscle regeneration by regulating inflammation in mice. *J. Biol. Chem.* 295 (30), 10212–10223.
- Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., Nikitin, A.Y., 2007. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* 67 (18), 8433–8438.
- Cramer, R.M., Langberg, H., Magnusson, P., Jensen, C.H., Schroder, H.D., Olesen, J.L., Sueta, C., Teisner, B., Kjær, M., 2004. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J. Physiol.* 558, 333–340.
- Davidson, P.K., Gallagher, J.L., Hartman, J.W., Tamopolsky, M.A., Dela, F., Hedge, J.W., Timmons, J.A., Phillips, S.M., 2011. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. *J. Appl. Physiol.* 105 (3), 309–317.
- de la Luz Cadiz-Gurrea, M., de las, F., Nieves, I., Aguilera Saenz, L.M., Fernandez-Arroyo, S., Legaci-Mallet, L., Bouaziz, M., Segura-Carretero, A., 2019. Bioactive Compounds from Theobroma cacao: Effect of Isolation and Safety Evaluation. *Plant Foods Hum. Nutr.* 74, 40–46.
- De Los Santos, S., Palma-Flores, C., Zentella-Dehesa, A., Canto, P., Coral-Vázquez, R.M., 2018. (-)-Epicatechin inhibits development of dilated cardiomyopathy in delta sarcoglycan null mouse. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 28, 1188–1195.
- Dreyer, H.C., Blanco, C.E., Sattler, F.R., Schroeder, E.T., Wiswell, R.A., 2006. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* 33 (2), 242–253.
- Drummond, M.J., Dreyer, H.C., Fenning, B., Fry, C.S., Dhanani, S., Dillon, E.L., Sheffield-Moore, M., Volpi, E., Rasmussen, B.B., 2006a. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J. Appl. Physiol.* 104 (4), 1452–1461.
- Drummond, M.J., McCarthy, J.J., Fry, C.S., Easer, K.A., Rasmussen, B.B., 2006b. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (6), E1333–E1340.
- Farsani, Z.H., Banitalebi, E., Faramarzi, M., Bigham-Sadegh, A., 2019. Effects of different intensities of strength and endurance training on some osteometabolic miRNAs, Runx2 and PPARgamma in bone marrow of old male wistar rats. *Mol. Biol. Rep.* 46, 2513–2521.
- Pyke, J.J., Bishop, D.J., Zacharewicz, E., Russell, A.P., Stepto, N.K., 2016. Concurrent exercise incorporating high-intensity interval or continuous training modulates mTORC1 signaling and microRNA expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310 (11), R1297–R1311.
- Ganassi, M., Badoi, S., Wanders, K., Zammit, P.S., Hughes, S.M., 2020. Myogenin is an essential regulator of adult myofiber growth and muscle stem cell homeostasis. *Elife* 9.
- Ge, Y., Chen, J., 2011. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* 10 (3), 441–448.
- Guerrieri, D., Moon, H.Y., van Praag, H., 2017. Exercise is a Pill: The Latest on Exercise-Mimetics. *Brain Plast.* 2 (2), 153–169.
- Gutierrez-Salmeán, G., Giaraldi, T.P., Nogueira, L., Barboza, J., Tauh, P.R., Hogan, M.C., Henry, R.R., Meaney, E., Villarreal, F., Ceballos, G., Ramirez-Sanchez, I., 2014. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* 25 (1), 91–94.
- He, J., Wang, F., Zhang, P., Li, W., Wang, J., Li, J., Liu, H., Chen, X., 2017. miR-491 inhibits skeletal muscle differentiation through targeting myomaker. *Arch. Biochem. Biophys.* 625–626, 30–38.
- Hoffman, N.J., 2017. Omics and Exercise: Global Approaches for Mapping Exercise Biological Networks. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7 (10), a029884.
- Horak, M., Novak, J., Bisenertova-Vasku, J., 2016. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 410 (1), 1–13.
- Houselle, A., Duhmann, D., Nascimento, E.R.M., Schaart, G., Jørgensen, J.A., Moonen-Korenijns, E., Kersten, S., Wang, X., Hoeks, J., 2020. MicroRNA-204-5p modulates mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes and associates with oxidative capacity in humans. *J. Cell. Physiol.* 235 (12), 9851–9863.
- Kirby, T.J., McCarthy, J.J., 2013. MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radic. Biol. Med.* 64, 95–105.
- Lee, S.M., Lee, M.C., Bae, W.R., Yoon, K.J., Moon, H.Y., 2022. Muscle fiber type-dependence effect of exercise on genomic networks in aged mice models. *Aging* 14 (8), 3337–3364.
- Legerlotz, K., Smith, H.K., 2008. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised Muscle. *Muscle Nerve* 38 (3), 1087–1100.

- Li, G., Li, Q.S., Li, W.R., Wei, J., Chang, W.K., Chen, Z., Qiao, H.Y., Jia, Y.W., Tian, J.H., Jiang, B.S., 2016. miRNA targeted signaling pathway in the early stage of denervated fast and slow muscle atrophy. *Neural Regen Res.* 11, 1293–1303.
- Liu, N., Williams, A.H., Maxiner, J.M., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Richardson, J. A., Baszel-Duby, R., Olson, E.N., 2012. microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Invest.* 122 (6), 2054–2065.
- Margolis, L.M., McClung, H.L., Murphy, N.E., Carrigan, C.T., Pasiakos, S.M., 2017. Skeletal Muscle myomiR Are Differentially Expressed by Endurance Exercise Mode and Combined Essential Amino Acid and Carbohydrate Supplementation. *Front. Physiol.* 8, 182.
- McCarthy, J.J., Esser, F.A., 2007. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 102 (3), 306–313.
- Mestdagh, F., Van Vlierberghe, P., De Weer, A.N., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J., 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 10 (6), R64.
- Mok, G.F., Lozano-Velasco, E., Maniou, E., Vaut, C., Mozon, S., Wheeler, G., Munsterberg, A., 2018. miR-133-mediated regulation of the Hedgehog pathway orchestrates embryo myogenesis. *Development* 145.
- Moreno-Ulloa, A., Nogueira, L., Rodríguez, A., Barboza, J., Hogan, M.C., Ceballos, G., Villarreal, F., Ramirez-Sanchez, I., 2015. Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress, and Aging With (-)-Epicatechin in Senile Mice. *J. Gerontol. A Biol. Med. Sci.* 70 (11), 1370–1378.
- Mueller, M., Breil, F.A., Lurman, G., Klossner, S., Flück, M., Billeter, R., Däpp, C., Hoppeler, H., 2011. Different molecular and structural adaptations with eccentric and conventional strength training in elderly men and women. *Gerontology* 57 (6), 528–538.
- Munguia, I., Ortiz, M., González, C., Portilla, A., Meaney, E., Villarreal, F., Nájera, N., Ceballos, G., 2022. Beneficial Effects of Flavonoids on Skeletal Muscle Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Med. Food* 25 (5), 465–486.
- Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Åkerström, T., Nielsen, A.R., Pedersen, B.K., Laye, M. J., 2010. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 588, 4029–4037.
- Nielsen, S., Åkerström, T., Rinnov, A., Yfanti, C., Scheele, C., Pedersen, B.K., Laye, M.J., Eckel, J., 2014. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS ONE* 9 (2), e87308.
- Nogueira, L., Ramirez-Sanchez, I., Perkins, G.A., Murphy, A., Taub, P.R., Ceballos, G., Villarreal, F.J., Hogan, M.C., Malek, M.H., 2011. (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J. Physiol.* 589, 4615–4631.
- Petriz, R.A., Gomes, C.P.C., Almeida, J.A., de Oliveira, G.P., Ribeiro, F.M., Pereira, R.W., Franco, O.L., 2017. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome. *J. Cell Physiol.* 232 (2), 257–269.
- Phillips, R.E., Williams, J.P., Gustafson, T., Bouchard, C., Rankinen, T., Knudsen, S., Smith, K., Timmons, J.A., Atherton, P.J., Gibson, G., 2013. Molecular networks of human muscle adaptation to exercise and age. *PLoS Genet.* 9 (3), e1003389.
- Porter, C., Reidy, P.T., Bhattacharya, N., Siockos, L.S., Rasmussen, B.R., 2015. Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 47, 1922–1931.
- Ramirez-Sanchez, I., De los, S., Santos, Gonzalez-Basurto, S., Canto, P., Mendoza-Lorenzo, P., Palma-Flores, C., Ceballos-Reyes, G., Villarreal, F., Zentella-Dehesa, A., Coral-Vazquez, R., 2014. (-)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic delta-sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J.* 281, 5567–5580.
- Rao, P.K., Kumar, R.M., Parkhondeh, M., Bakerville, S., Lodish, H.P., 2006. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (23), 8721–8726.
- Rivas, D.A., Lessard, S.J., Rice, N.P., Lustgarten, M.S., So, K., Goodyear, L.J., Parnell, L. D., Fielding, R.A., 2014. Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. *FASEB J.* 28 (9), 4133–4147.
- Rosenberg, M.I., Georges, S.A., Anwarhacharn, A., Anala, E., Tapscott, S.J., 2006. MyoD inhibits Pax1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J. Cell Biol.* 175, 77–85.
- Shel, S., Park, S.-M., Radjabi, A.R., Schickel, R., Kistner, E.O., Jewell, D.A., Feig, C., Lengyel, E., Peter, M.E., 2007. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104 (27), 11400–11405.
- Si, H., Wang, X., Zhang, L., Parnell, L.D., Ahmed, S., LeRoith, T., Anah, T.-A., Zhang, L., Li, J., Ordovas, J.M., Si, H., Liu, D., Lai, C.-Q., 2019. Dietary epicatechin improves survival and delays skeletal muscle degeneration in aged mice. *FASEB J.* 33 (1), 965–977.
- Silva, F.C.D., Iop, R.D.R., Andrade, A., Costa, V.P., Gutierrez Filho, P.J.B., Silva, R.D., 2020. Effects of Physical Exercise on the Expression of MicroRNAs: A Systematic Review. *J. Strength Cond. Res.* 34, 270–280.
- Ultimo, S., Zauli, G., Martelli, A.M., Vitale, M., McCubrey, J.A., Capitani, S., Neri, L.M., 2018. Influence of physical exercise on microRNAs in skeletal muscle regeneration, aging and diseases. *Oncotarget* 9 (24), 17220–17237.
- Wackerhage, H., Schoenfeld, B.J., Hamilton, D.L., Lehti, M., Hulmi, J.J., 2019. Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. *J. Appl. Physiol.* 1985 (126), 30–43.
- Wang, C., Yun, F., Kuang, S., 2017. Muscle Histology Characterization Using H&E Staining and Muscle Fiber Type Classification Using Immunofluorescence Staining. *Biol. Protoc.* 7.
- Yamazaki, K.O., Romero-Perex, D., Barrata-Hidalgo, M., Cruz, M., Rivas, M., Cortez-Gomez, B., Ceballos, G., Villarreal, F., 2008. Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (2), H761–H767.
- Zacharewicz, E., Lamou, S., Russell, A.P., 2013. MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Front. Physiol.* 4, 266.