



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

(-) – EPICATEQUINA PROMUEVE LA REPARACIÓN DEL MÚSCULO  
TIBIAL ANTERIOR Y GASTROCNEMIO EN RATONES CD1 CON DAÑO  
INDUCIDO POR BaCl<sub>2</sub>

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MAGALLY RAMÍREZ RAMÍREZ**

TUTOR:

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DR. ISMAEL JIMENEZ ESTRADA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, A 05 DE MARZO DE 2023



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.

## AGRADECIMIENTOS

Toda mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por creer en mí y darme la oportunidad de realizar este posgrado.

El siguiente trabajo de investigación fue realizado gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número de CVU 774643, con el apoyo económico: Beca Doctoral No. 604362.

Este trabajo fue realizado en la División de Investigación Biomédica de la Subdirección de Enseñanza e Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, bajo la asesoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este proyecto no se hubiera realizado sin el apoyo del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, tutor principal, la Dra. Diana Escalante Alcalde y el Dr. Ismael Jiménez Estrada, comité tutor, gracias por todos sus consejos e interés en realizar un trabajo de calidad y contribuir en mi formación académica.

También, me gustaría agradecer a todas las personas que me acompañaron en este camino, a aquellas que me brindaron apoyo y sobretodo su amistad, jamás olvidaré estos días, a mis amigos Ari, Yali, Nati, Isa, Luis, Dulce, Froy, Pao, Karen, Javier, Don Agus, Gabo, Andy, Dianita, Viry, Checo, a mi amiga y mentora Alexandra, a mi amiga y gran apoyo Mirna, gracias viejitas; y sin duda, gracias a mi familia adorada que me impulsa a seguir mis sueños y a no rendirme, siempre los llevo en cada nueva aventura, Saúl, Jarumi, a mi papi y a mi mami, a mis hermanos de corazón Prisma, Edith, Adriana, Andresuchis gracias por sus consejos. Finalmente, gracias Arnold, por acompañarme en mis experimentos y darme la oportunidad de crecer, nunca olvidaré esta etapa. Sé que hay muchas más personas que me ayudaron y no cabrían en estas páginas, sé que saben que cuentan conmigo, un abrazo para todos ustedes y mis mejores deseos.

“La lógica te llevará de la A a la Z. La imaginación te llevará a cualquier lugar”

Albert Einstein

Con todo mi amor, mi

Meruchan

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUCCIÓN.....	11
<b>Desarrollo embrionario del músculo esquelético</b> .....	11
<b>Características y función del músculo esquelético</b> .....	11
<b>Proteínas miogénicas</b> .....	12
<b>Células satélites</b> .....	14
<b>Reparación del músculo esquelético</b> .....	15
<b>Miopatías</b> .....	17
<b>Distrofia muscular</b> .....	17
<b>Sarcopenia</b> .....	17
<b>Miopatías autoinmunes</b> .....	18
<b>Miopatías congénitas</b> .....	18
<b>Miopatías generadas por toxicidad</b> .....	19
<b>Miopatías metabólicas</b> .....	19
<b>(-)-Epicatequina</b> .....	20
<b>Epi como potencial tratamiento terapéutico</b> .....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVOS.....	28
<b>GENERAL</b> .....	28
<b>PARTÍCULARES</b> .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
<b>Modelo animal</b> .....	29
<b>Tibial anterior</b> .....	30
<b>Gastrocnemio</b> .....	31
<b>Diseño experimental</b> .....	33
<b>Modelo de daño muscular con BaCl<sub>2</sub></b> .....	33

<b>Análisis histológico</b> .....	34
<b>Análisis morfométrico</b> .....	34
<b>Análisis molecular por Western blot</b> .....	35
<b>Análisis estadístico</b> .....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	37
<b>Epi promueve la reparación del músculo Tibial anterior</b> .....	37
<b>Epi promueve la reparación del músculo gastrocnemio</b> .....	41
<b>Epi no modifica el nivel de proteína de miostatina durante la reparación del músculo Tibial anterior</b> .....	42
<b>Epi no modifica los niveles de proteína de <math>\beta</math>- catenina (activa) durante la reparación del músculo gastrocnemio</b> .....	46
<b>Epi promueve la recuperación del área de las fibras dañadas a los 15 días del músculo Tibial anterior</b> .....	49
<b>DISCUSIÓN</b> .....	54
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	62
<b>REFERENCIAS</b> .....	64
<b>PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS</b> .....	76

## ABREVIATURAS

---

<b>Epi</b>	(-)- Epicatequina
<b>TA</b>	<i>Tibial anterior</i>
<b>SD-E</b>	Sin daño, sin Epi
<b>SD+E</b>	Sin daño, con Epi
<b>CD-E</b>	Con daño, sin Epi
<b>CD+E</b>	Con daño, con Epi
<b>CD1</b>	Cepa de ratón no consanguíneo
<b>CSA</b>	Cross sectional area
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>MyHC</b>	Cadena pesada de Miosina
<b>MyHCemb+</b>	Cadena pesada de Miosina embrionaria, positive
<b>Myf5</b>	Factor miogénico 5
<b>Pax7</b>	Paired box 7
<b>MyoD</b>	Proteína 1 de diferenciación miogénica
<b>MRF4</b>	Gen de regulación miogénica
<b>CD34</b>	Cúmulo de diferenciación 34
<b>Pax3</b>	Paired box 3
<b>Meox2</b>	Proteína Mesenchyme Homeobox 2
<b>MPC</b>	Células precursoras musculares
<b>ANP</b>	Péptido natriurético atrial
<b>BNP</b>	Péptido natriurético cerebral
<b>PI3K</b>	Familia fosfoinositol 3-quinasas
<b>Akt</b>	Protein kinase B
<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin
<b>p70S6K</b>	Proteína ribosómica S6 quinasa beta-1

<b>NS</b>	No significativo
<b>C57BL/6</b>	Cepa de ratón endogámica
<b>p38MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos p38
<b>C2C12</b>	Línea celular de mioblastos de ratón inmortalizada
<b>Pax7-DTA</b>	Paired box 7 (Pax7)-diphtheria toxin fragment A (DTA) mouse
<b>EDL</b>	Músculo extensor de los dedos largos
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ co-activator 1 $\alpha$
<b>PGC1<math>\beta</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ co-activator 1 $\beta$
<b>Tfam</b>	Factor de transcripción mitocondrial A

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Tabla 1. Caracterización del tipo de fibras que presenta el TA. ....	30
Tabla 2. Caracterización del tipo de fibras que presenta el músculo gastrocnemio .....	32
Figura 1. Esquema en donde se observan las vías involucradas en la miogénesis de la somita hipoaxial y epiaxial, los músculos de las extremidades, y los braquioméricos.....	13
Figura 2. Estructuras de los diasteroisómeros de Epicatequina y de Catequina... 21	
Figura 3 Metabolitos generados después de la ingestión de Epi en humanos.....	22
Figura 4 Microfotografía de una sección transversal del músculo Tibial anterior sin daño y sin Epi, teñido con tricrómico modificado de Gomori.....	31
Figura 5. Microfotografía ilustrando un corte transversal de un músculo gastrocnemio sin daño y sin Epi teñido con tricrómico modificado de Gomori.....	32
Figura 6. Epi disminuye el área de daño desde el primer día después del daño..	38
Figura 7. El área de daño a las 12h no muestra diferencias entre los grupos con daño.. .....	39
Figura 8. Porcentaje de núcleos centrales presentados después del daño.. .....	41
Figura 9. Epi disminuye el área de daño del músculo gastrocnemio.....	42
Figura 10. Miostatina no se modifica significativamente con el tratamiento con Epi en el músculo TA.....	43
Figura 11. Epi incrementa MyoD después de un día de tratamiento en el grupo con daño en el músculo TA.....	44
Figura 12. Epi incrementa miogenina después de un día de daño en el grupo con daño en el músculo TA.....	45
Figura 13. Epi incrementa $\beta$ -catenina (activa) después de un día en el grupo con daño en el músculo TA.....	46
Figura 14. Epi no modifica MyoD en ninguno de los grupos en el músculo gastrocnemio.....	47
Figura 15. Epi promueve una mayor cantidad de miogenina en el grupo SD+E en el músculo gastrocnemio un día después del daño.....	48
Figura 16. Epi no modifica los niveles de $\beta$ -catenina (activa) en el músculo gastrocnemio.....	49
Figura 17. Epi promueve la recuperación del área del músculo dañado a los 15 días en el músculo TA.....	50
Figura 18. Epi incrementa el tamaño de las fibras tipo II, del músculo gastrocnemio a los 15 días.....	53



## RESUMEN

---

El músculo esquelético es un tejido dinámico necesario para funciones esenciales como la locomoción y la respiración. Este tejido tiene la capacidad de repararse a sí mismo; sin embargo, debido a diversas enfermedades tanto de origen genético (distrofias musculares) como adquiridas (sarcopenia, caquexia, etc), la reparación se ve comprometida. Como alternativa se han propuesto diversas terapias; no obstante, ninguna de ellas es completamente efectiva, e incluso pueden ser muy costosas o invasivas. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de alternativas que puedan contribuir a estimular la reparación muscular.

En este contexto, el flavonol epicatequina (en adelante, Epi) es un componente abundante en el cacao que ha mostrado múltiples beneficios en la salud humana. En nuestro equipo de trabajo hemos observado que después de dos semanas de tratamiento con Epi, el músculo esquelético y cardíaco mejoran el equilibrio de óxido/reducción, incluyendo proteínas relacionadas con la función mitocondrial, y disminuyendo la fibrosis en el modelo deficiente para  $\delta$ - sarcoglicano, un modelo de distrofia muscular.

En el presente estudio se evaluaron los efectos de Epi sobre el proceso de reparación del músculo esquelético (Tibial anterior y gastrocnemio) dañado por una lesión química con  $BaCl_2$  en ratones CD1. Se evaluaron por Western blot las proteínas implicadas en miogénesis y en el crecimiento muscular, y la activación de  $\beta$ -catenina (activa); de igual manera se evaluó histológicamente la morfometría muscular de los ratones con y sin tratamiento.

Se demostró que el tratamiento con Epi incrementó diferencialmente el nivel de las proteínas miogénicas MyoD y miogenina; así como de  $\beta$ -catenina, a partir de las 24h posteriores al daño, en los músculos Tibial anterior y gastrocnemio. Este incremento se asoció con una reparación muscular más rápida en ambos tipos musculares. Además, se observó que Epi promueve la hipertrofia de las fibras musculares tipo II del gastrocnemio a los 15 días después del tratamiento tanto en el grupo control, como en el grupo dañado.

## ABSTRACT

---

The skeletal muscle is a dynamic tissue which is required for its essential functions such as locomotion and respiration; this tissue has the ability to repair itself through stem cells, called "satellite cells".

For several diseases, the skeletal muscle has the ability to repair itself; however, due to several diseases of both genetic origin (muscular dystrophies) and acquired (sarcopenia, cachexia, etc.) repair is compromised. Therapies have been proposed as an alternative; however, none of them is completely effective, and they can even be very expensive or invasive. Therefore, it is necessary to search for alternatives that can help to stimulate the muscle repair.

In this context, the flavonol Epicatechin (hereinafter, Epi) is a component of cocoa that has multiple benefits to human health. In our work team we have observed that two weeks of treatment with Epi improves the balance of oxide/reduction, including proteins related to mitochondrial function, and decreasing fibrosis in the deficient model for  $\delta$ -sarcoglycan, a model of muscular dystrophy.

In the present study, the effects of Epi on the repair process of skeletal muscle (Tibial anterior and gastrocnemio) damaged by chemical injury with BaCl<sub>2</sub> in CD1 mice were evaluated. Proteins involved in myogenesis and muscle growth, and  $\beta$ -catenin activation (active) were evaluated by Western blot; similarly, the muscle morphometry of mice with and without treatment was evaluated histologically.

Treatment with Epi was shown to have an effect on the amount of myogenic proteins from 24 h after the damage, differentially between the evaluated muscles, Tibial anterior and gastrocnemio. But favoring muscle repair for both through different mechanisms. As well as promoting type II fiber hypertrophy 15 days after treatment in gastrocnemio muscle, in both groups: control group and damaged group.

## INTRODUCCIÓN

---

### **Desarrollo embrionario del músculo esquelético**

Los músculos esqueléticos, excepto los de la cabeza, son derivados de la condensación del mesodermo paraxial, mesodermo que se encuentra dentro de estructuras epiteliales denominadas somitas. Las somitas se encuentran localizadas a lo largo del eje rostro-caudal del embrión, y están organizadas en compartimentos dorso-ventrales (Sambasivan, *et al.*, 2013). La parte más ventral es el esclerotomo, el cual dará origen al esqueleto axial; dorsalmente, el dermomiótomo está compuesto por células que darán origen a la dermis y a las células progenitoras musculares (MPC, por sus siglas en inglés). Los bordes del dermomiótomo pasarán por una transición epitelial a mesénquima y a formar el tercer compartimento somático: el miótomo, el cual contiene a las primeras miofibras diferenciadas. La somita epiaxial (dorso-medial) es parte del dermomiótomo y miótomo que dará origen a los músculos de la espalda, mientras que la somita hipoaxial (ventro-lateral) dará origen al resto del tronco y los músculos de las extremidades (Bismuth & Relaix, 2010).

### **Características y función del músculo esquelético**

El músculo esquelético es un tejido altamente organizado el cual conforma un 40% de la masa del cuerpo humano y participa activamente en diversas funciones esenciales tales como el metabolismo, la locomoción y la respiración (Demonbreun & McNally, 2017). El cuerpo humano contiene aproximadamente 640 músculos, y cada uno de ellos realiza diferentes funciones en la fisiología humana (Randolph & Pavlath, 2015).

El músculo esquelético de los mamíferos adultos es un tejido dinámico, en términos de remodelación, de reparación y de regeneración; ya que las células pueden sufrir cambios fisiológicos basados en la actividad física diaria generando atrofia, hipertrofia o cambio del tipo de fibra (Ceafalan, *et al.*, 2018).

En los mamíferos, el número de fibras en cada músculo está determinada desde el nacimiento y se mantiene aún con los cambios a lo largo de la vida; excepto cuando el músculo presenta alguna enfermedad (miopatía). Por otro lado, las miofibrillas y, por lo tanto, el área transversal de las fibras (CSA) puede cambiar de acuerdo con las exigencias del músculo, como el crecimiento (denominado hipertrofia), o la disminución del músculo (denominada atrofia), que puede ser causado por inmovilización, inactividad, enfermedad y/o envejecimiento (Brooks, 2003).

Cada fibra individual está constituida por proteínas contráctiles, denominadas miosina y actina incorporadas en cada uno de los filamentos gruesos y delgados, respectivamente, los cuales se encuentran arreglados longitudinalmente (Brooks, 2003). La heterogeneidad de las fibras musculares es una característica del músculo que permite su adaptación a los cambios metabólicos. Se han descrito tres tipos principales de fibras de acuerdo con su composición de MyHC (cadena pesada de miosina, por sus siglas en inglés), las fibras 2A y las fibras 2B, fibras rápidas, que tienen altos niveles de enzimas glucolíticas, a pesar de tener diferentes complementos de enzimas oxidativas; y las fibras oxidativas, fibras lentas, o fibras tipo I que contienen un mayor número de mitocondrias (Schiaffino, 2011). Se debe considerar que las fibras musculares no son completamente puras en cuanto a su composición de MyHC, pues pueden ser híbridas, por ejemplo, fibras que coexpresan el tipo I y 2X (miosina híbrida).

## **Proteínas miogénicas**

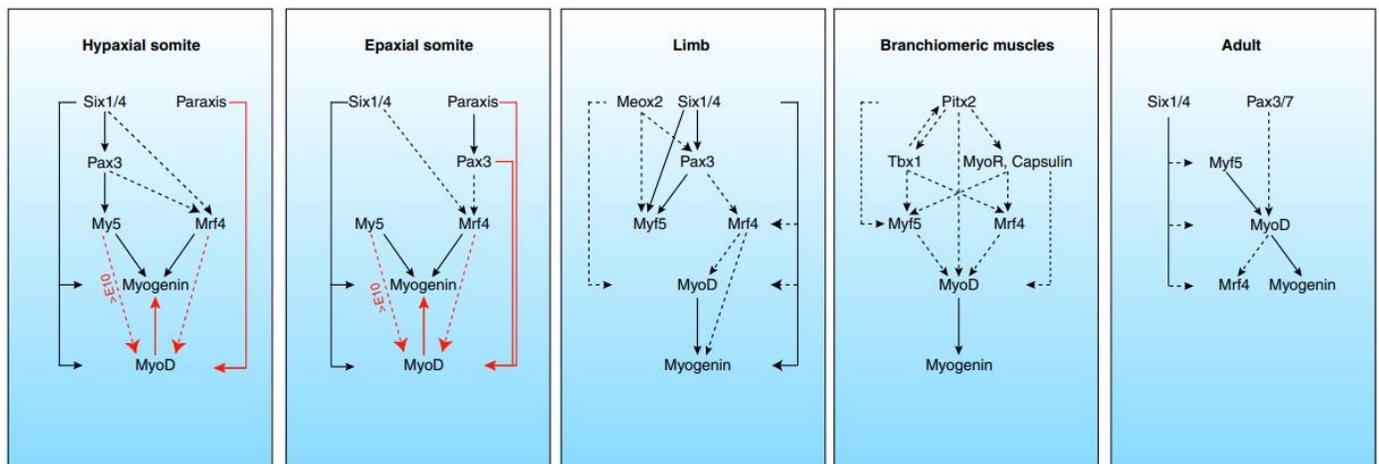
La miogénesis es un proceso de múltiples etapas, que involucra la diferenciación de las células progenitoras miogénicas a mioblastos, la proliferación de mioblastos, la salida del ciclo celular para la diferenciación en miotubos, y la fusión de estos para formar fibras musculares. Los factores que regulan la miogénesis MRF, (por sus siglas en inglés) son Myf5, MyoD (MyoD1), miogenina, y Mrf4 (también conocido como Myf6), los cuales son determinantes para que estas etapas ocurran.

Durante la embriogénesis, el primer factor de regulación miogénico expresado es Myf5, este actúa de manera transitoria en el mesodermo paraxial previo a la miogénesis (Carvajal & Rigby, 2010). En ratones, el factor Pax3 actúa río arriba del Myf5, interesantemente la ausencia de

Pax3, Myf5 y Mrf4, anulan la formación de todos los músculos del cuerpo, demostrando que estos factores también actúan río arriba de MyoD. El factor de transcripción miogenina está río abajo del Myf5 y de Mrf4, la miogenina es necesaria para la fusión de mioblastos mononucleados y la formación de miotubos (Bismuth & Relaix, 2010).

En el músculo adulto, el factor determinante miogénico 1 (MyoD) fue el primer factor que se identificó (Hernández-Hernández, *et al*; 2017). Dicho factor es importante, ya que durante la migración de células progenitoras miogénicas a mioblastos es activado a través de dos vías: la primera es a través de Pax3 y de Myf5, y la segunda vía es a través de Pax3 y de Pitx2, el cual actúa directamente en MyoD; ésta induce la diferenciación y la expresión de ciclinas dependientes de la proteína inhibidora de cinasas p21 (Asfour, 2018; Adhikaril, 2021) Figura 1.

Por su parte, en el músculo adulto, miogenina influencia el número de células satélites, y es requerida para que estas adopten su posición normal en el nicho. Este factor, también contribuye a mantener la quiescencia, y regular la expresión de genes involucrados en la señalización de mTORC1 y el crecimiento de las miofibras (Ganassi, 2020).



**Figura 1. Esquema en donde se observan las vías involucradas en la miogénesis de la somita hipoaxial y epiaxial, los músculos de las extremidades, y los braquioméricos.** Bismuth & Relaix (2010), distinguen dos modelos de interacción a nivel transcripcional (línea continua), e interacción genética (línea punteada). Tanto en la somita hipoaxial, como en la epiaxial, MyoD inicia la diferenciación en la jerarquía genética a los diez días de desarrollo embrionario en ratón (línea roja).

Algunos otros factores que también regulan al músculo esquelético adulto son la miostatina y folistatina. Miostatina es miembro de la familia TGF- $\beta$  que actúa como un regulador negativo

del crecimiento muscular, estudios con modelos murinos han sugerido que la pérdida de esta proteína genera efectos benéficos en enfermedades como la distrofia, atrofia muscular espinal, caquexia, miopatía inducida por esteroides y la sarcopenia generada por la edad. Una de las proteínas que la regula es la folistatina, la cual es capaz de actuar como un antagonista potente de miostatina al unirse directamente a miostatina (Lee S.-J., 2010) o bien unirse a los receptores de activina y neutralizar su actividad (Patel, 1998).

Otro factor importante en la reparación muscular es el co-activador  $\beta$ -catenina, el cual es conocido por ser crítico en la miogénesis durante el desarrollo embrionario y la vida adulta.  $\beta$ -catenina depende del ligando Wnt, sin este ligando,  $\beta$ -catenina se mantiene en el citoplasma, y en conjunto con el complejo de degradación y GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina es fosforilada en la serina N-terminal, los residuos de treonina marcan a  $\beta$ -catenina para su degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma. Cuando Wnt se encuentra presente, el complejo de degradación es inhibido y  $\beta$ -catenina está activa, sin fosforilar, por lo cual puede ser translocada al núcleo y regular los genes que dependen de Wnt a través de los factores de transcripción TCF/LEF (Agle, *et al.*, 2017).  $\beta$ -catenina activa, en coordinación con MyoD, es esencial para la diferenciación de los mioblastos a miofibros (Ciu, *et al.*, 2019), así también, desempeña un papel importante en la hipertrofia muscular, regulando factores miogénicos como Miogenina y MyoD (Goh & Millay, 2017; Armstrong & Esser, 2005; Motohashi & Asakura, 2014).

## **Células satélites**

Los músculos esqueléticos están compuestos de miofibrillas o células musculares, éstas conforman sincitios largos. Entre la lámina basal y la membrana de las células de la miofibrilla se encuentran las células satélites, las cuales son encargadas de llevar a cabo la reparación del músculo (Guardiola, *et al.*, 2012; Demonbreun & McNally, 2017)

Las células satélites comprenden del 30-35% de todos los núcleos en las fibras del músculo de ratón neonato y posteriormente, el número de núcleos disminuye a 2.5-6% en el músculo de ratón adulto. Estas células se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Pax7, el cual fue identificado como el primer marcador cuantificable, ya que se encuentra tanto en las

células satélite en estado quiescente, como en el activado, y es esencial para su desarrollo y sobrevivencia. Los factores miogénicos como MyoD, Myf5, Mrf4 y miogenina, juegan un papel importante en la especificación miogénica, diferenciación y mantenimiento durante el desarrollo del músculo y la regeneración (Motohashi & Asakura, 2014).

El mantenimiento del balance entre la diferenciación de células satélite y su propia auto renovación es requerido para la homeostasis del músculo., ya que se ha determinado que la ablación de las células satélites a los 5 días del daño impacta de manera drástica a la regeneración, resultando en una reducción del 89% de las miofibras regeneradas, así como una reducción del 38% del peso de los músculos dañados y una disminución del 60% del área de las fibras.

Cabe resaltar, también, que el perfil molecular de las células satélites varía de acuerdo al músculo en el que se encuentran (Torres, *et al.*, 2015), por ejemplo, las células satélites del músculo del diafragma expresa mayores niveles de Pax3 en comparación al resto de los músculos, las células satélites de los músculos extraoculares presentan mayores niveles de Alx4, Pitx1, Pitx2 y Tcf21, que las células satélites de los músculos de las extremidades, y las células satélites de la cabeza expresan niveles más bajos de Pax3 and Lbx1 en comparación a las células satélite de las extremidades (Biressi & Rando, 2010), sólo por mencionar algunos; por lo que se requiere investigar las diferencias que existen entre las células satélite de los músculos para entender los mecanismos que modifican su capacidad regenerativa.

## **Reparación del músculo esquelético**

La reparación del músculo esquelético se lleva a cabo inicialmente a través de la acción de disferlina, que es un sistema que repara los miotubos. Cuando el daño es mayor, se activan entonces las células satélites (Bittel, *et al.*, 2020).

La regeneración del músculo esquelético ocurre en dos fases: una fase de degeneración y una fase de regeneración (Ceafalan, *et al.*, 2018). Muchas de las características de la fase de degeneración involucran daño del sarcolema o necrosis de la miofibra, consecuentemente se presenta una influencia de células mononucleares e inflamatorias y un incremento en fibroblastos. Los remanentes intactos de la lámina basal actúan como un andamio para la

siguiente fase, la de regeneración (Randolph & Pavlath, 2015). Dependiendo de la severidad del daño, es frecuente la activación de macrófagos que fagocita a las fibras dañadas, y de esta forma se pueden generar fibras por completo nuevas de un calibre pequeño; para posteriormente provocar hipertrofia en el músculo al adicionar más mioblastos a estas fibras, y restablecer la arquitectura histológica característica del músculo, no sin antes activar genes que promueven la miogénesis y la generación de MyHC de tipo embrionario.

Con el fin de mantener el proceso de reparación es llevada a cabo una división celular de tipo asimétrica por las células satélite, que por un lado permite llevar a cabo la diferenciación y por el otro mantener el nicho de células satélites disponibles para un próximo daño (Wallace, 2009). Esto es importante ya que como el trabajo de Collins y cols. (2005) demuestran, un número limitado de células satélites son suficientes para recuperar a la mayoría de las fibras musculares dañadas.

Durante el proceso de regeneración, las células satélites y los fibroblastos, recíproca y positivamente, regulan la expansión uno del otro. Posteriormente, durante la fase de latencia el número de fibroblastos son regulados por las células satélites, de manera negativa, por lo que la inhibición de la fibrosis como terapia para algunas patologías, debe tomarse con reserva con el fin de no interferir en el proceso de reparación (Stearns-Reider, *et al.*, 2017).

De manera normal, durante la regeneración, miostatina también es un gen clave en el crecimiento de la masa muscular; ratones con el gen anulado tienen un crecimiento muscular significativo, atribuido tanto a la hiperplasia como a la hipertrofia de las fibras del músculo durante su desarrollo. Smith y cols. (2014), observaron que la concentración de los mensajeros de MyoD, Myf5 y de miogenina, incrementan progresivamente en el músculo femoral de los ratones nulos para miostatina durante la inmovilización de la extremidad; no así para los ratones sin la modificación genética. Esta condición permanece aún después de retornar la pierna a su condición normal hasta los 3 días. Sin embargo, al evaluar al músculo gastrocnemio no se observó diferencia alguna entre los músculos de los ratones nulos para el gen y los ratones silvestres, lo cual sugiere que existen diferentes tipos de susceptibilidad a la atrofia por parte de cada uno de los músculos. De acuerdo con este estudio una terapia con antagonistas para miostatina podría no ser benéfico para la atrofia del músculo esquelético, pero sí, para el proceso de recuperación, donde el músculo es más activo.

## **Miopatías**

Las miopatías son afecciones de la fibra muscular o en el tejido intersticial ocasionado por alteraciones eléctricas, bioquímicas u orgánicas; siempre que no exista una alteración previa en el Sistema Nervioso Central o en el Sistema Nervioso Periférico que las origine.

Algunos síntomas de las miopatías incluyen rigidez, espasmos o debilidad; pueden ser clasificadas como: miopatías congénitas, distrofias musculares, miopatías mitocondriales, enfermedades por almacenamiento de glucógeno, miogloburinas, dermatomiositis, miositis osificantes, parálisis periódico familiar, polimiositis, miositis con inclusión de cuerpos y miopatías relacionadas, neuromiotonia, síndrome stiffman, rigidez, calambres musculares, y tétanos (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2019). A continuación, se describen algunos tipos de miopatías.

### **Distrofia muscular**

Las distrofias musculares son un conjunto de enfermedades en las que el músculo esquelético es afectado por diversas mutaciones genéticas, las cuales se caracterizan por la pérdida progresiva de la fuerza muscular, así como el incremento en la degeneración muscular, con ciclos de necrosis y apoptosis, y de regeneración. Las distrofias musculares más comunes son las sarcoglicanopatías y distrofinopatías que comparten una progresiva degeneración muscular que usualmente involucra al músculo cardíaco (Wallace, 2009; Calve, S., 2012).

### **Sarcopenia**

La sarcopenia, es la pérdida involuntaria de masa muscular y función debido al envejecimiento. La causa de la pérdida de miofibras es aún poco conocida; se les ha atribuido a anomalías en las mitocondrias que se acumulan con el tiempo, encendiendo vías apoptóticas y de necrosis, contribuyendo así a la atrofia del músculo, y a la acumulación de estrés oxidativo, así como

deleciones en el ADN mitocondrial (Cheema, 2015). Estudios recientes han mostrado que la dinámica molecular en la matriz extracelular tiene efecto en la dinámica de remodelación celular, así como alteraciones en el microambiente, tales como la disrupción de la matriz extracelular, la vascularización del músculo esquelético y la fibrosis, las cuales pueden afectar el mantenimiento de la masa muscular y el potencial regenerativo. El daño repetitivo en el músculo esquelético promueve una mayor fibrosis y una menor capacidad regenerativa. Stearns-Reider y cols. (2017), observaron que la disminución en la expresión de genes de colágeno, incluido Col3a1 y Col6a1 afecta la capacidad de reparación muscular en este tipo de miopatía.

### **Miopatías autoinmunes**

Las miopatías autoinmunes se presentan en 5 condiciones más frecuentes, las cuales son denominadas como dermatomiositis, polimiositis, y miositis (asociada con el síndrome anti sintetasa), así como la miopatía necrotizante inmunomediada, y miositis con inclusión de cuerpos. Cada una de estas enfermedades tiene características particulares, pero todas comparten un componente inmunológico común (McGrath, 2018).

### **Miopatías congénitas**

Las miopatías congénitas es un grupo de enfermedades clínicamente, genéticamente e histológicamente heterogéneas que afectan al músculo esquelético. La presencia de alteraciones histopatológicas en biopsias es lo que las distingue de las enfermedades neuromusculares. Las miopatías congénitas son causadas por defectos determinados genéticamente en proteínas estructurales del músculo y clasificadas con base a las características que presentan en la biopsia (Cassandrini, 2017).

## **Miopatías generadas por toxicidad**

Las miopatías generadas por toxicidad, son aquellas que ocurren por la acción de un compuesto, tales como el alcohol (Simon, *et al*; 2019), el cual es capaz de generar debilidad muscular; o bien debido a medicamentos empleados para disminuir el colesterol, particularmente las estatinas, drogas que se ha descrito que generan miopatías. Existen medicamentos que pueden de manera directa o indirecta generar un efecto adverso en el músculo esquelético. Un efecto tóxico indirecto podría ser a través de la modificación del balance de electrolitos o induciendo una reacción inmunológica, la consecuencia clínica de esto es desde dolor hasta la formación de rabdomiólisis. Por ejemplo, cloroquina e hidrocloroquina, compuestos empleados para tratar la dermatomiositis, sarcoidosis, lupus eritematoso y otras enfermedades de tejido conectivo debido a su efecto inmunomodulador, algunos pacientes tratados con estos compuestos con el tiempo desarrollan debilidad y atrofia muscular, la cual empeora más en las piernas que en los brazos, con la posibilidad de desarrollar cardiomiopatía (Pasnoor, 2014).

## **Miopatías metabólicas**

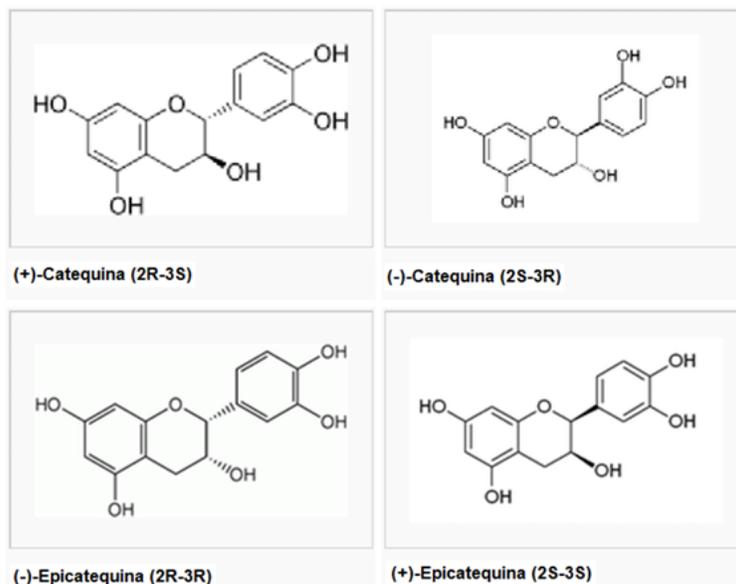
Las miopatías metabólicas son afecciones del músculo esquelético generadas por deficiencias enzimáticas, determinadas genéticamente. Dichas deficiencias enzimáticas generan acumulación de glucógeno y pérdida de la estructura de diferentes órganos, principalmente en el músculo esquelético, corazón e hígado. La forma clásica de inicio infantil de estas miopatías ocurre en los primeros meses de vida con hipotonía generalizada y debilidad muscular, cardiomegalia severa, dificultades para alimentarse, retraso del crecimiento e insuficiencia respiratoria. Algunas enfermedades que son el resultado de estas deficiencias enzimáticas son las enfermedades de Pompe, de Cori, de McArdle, por deficiencia sistémica de carnitina, por deficiencia de carnitina palmitol transferasa II (CPT-II) y deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasa (MADD) (Angelini, 2015).

## **(-)- Epicatequina**

Existen algunos padecimientos en los que la reparación está comprometida, como lo son en las distrofias musculares o por efecto secundario en alguna enfermedad como la diabetes tipo 2 (D'Souza D. M., 2013), con el fin de mejorar la capacidad regenerativa del músculo se han propuesto algunas terapias (Liu, *et al.*, 2019; Incitti, *et al.*, 2020); sin embargo, ninguna de éstas han podido ser completamente efectivas e incluso algunas son muy costosas o invasivas (Liu, *et al.*, 2019; Albuquerque, *et al.*, 2014; Houang, *et al.*, 2015; Rinaldi, *et al.*, 2016). Por tal motivo, moléculas de origen natural como (-)-Epicatequina se han estudiado como adyuvantes en el proceso de reparación.

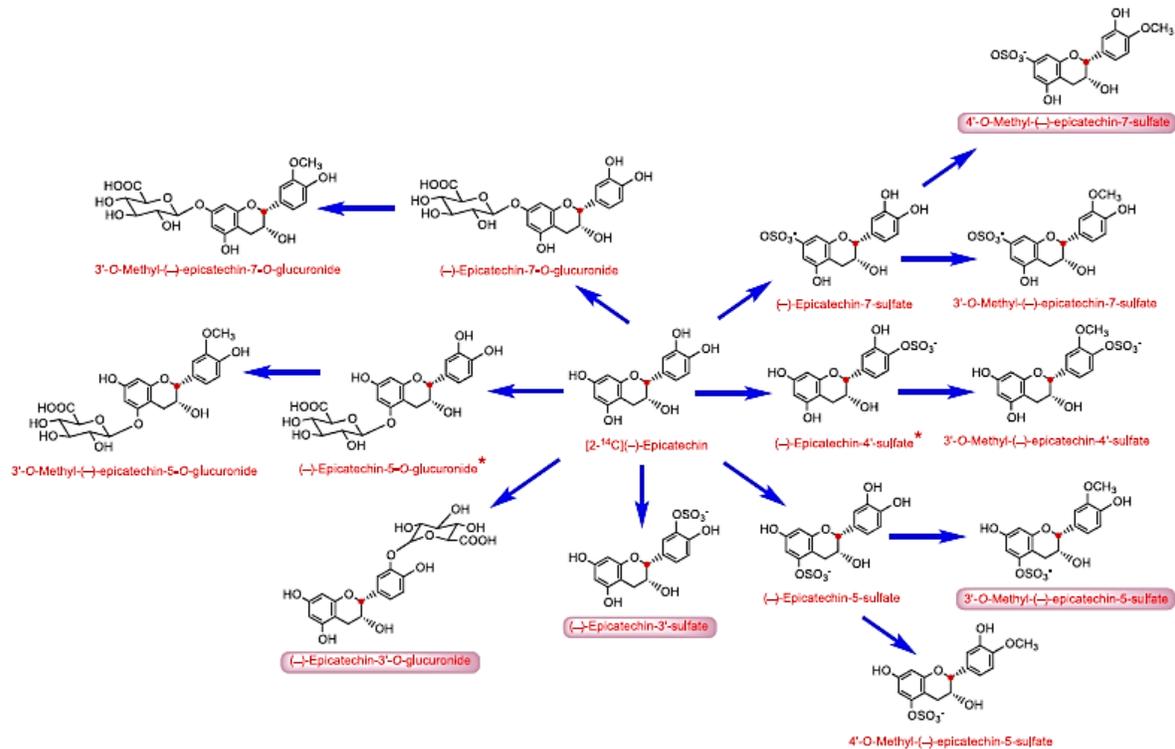
(-)- Epicatequina pertenece al grupo de los flavonoides, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano (C6-C3-C6'), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido siquímico. (-)- Epicatequina es un flavonol derivado del ácido hidroxicinámico; y se encuentra predominantemente en el cacao, junto con catequinas y procianidinas (Quiñones, *et al.*, 2012).

Catequina y Epicatequina poseen 2 anillos de fenilo (A y B) unidos a través de un dihidropirano heterocíclico, con un grupo hidroxilo en el Carbono 3, la molécula presenta dos centros quirales en el Carbono 2 y 3, por lo que tienen cuatro diastereoisómeros (Rinaldo, 2010) (Figura 2).



**Figura 2. Estructuras de los diastereoisómeros de Epicatequina y de Catequina (Rinaldo, 2010).**

(-)- Epicatequina, en adelante Epi, entra al sistema circulatorio en forma de metabolitos glucoronidados, sulfatados, y metilados (Moreno-Ulloa, *et al.*, 2018). Se ha observado que el consumo de 40g de chocolate negro contiene aproximadamente 282mmol (3.27 mg) de Epi. Después de 2h de su consumo, Epi se encuentra en el plasma sanguíneo, lo que es indicativo de que la absorción de la Epi es llevada a cabo en el intestino delgado, excretándose alrededor del 20.1% de lo ingerido en el humano. A continuación, se presenta un esquema (Figura 3), en el que se resumen las rutas propuestas para el metabolismo de Epi (Borges, *et al.*, 2018).



**Figura 3 Metabolitos generados después de la ingestión de Epi en humanos.** El esquema muestra las rutas metabólicas y metabolitos generados una vez ingerida Epicatequina, en los recuadros se indican los nombres de los productos que se acumulan en el plasma y en la orina, las flechas azules indican que las conversiones están catalizadas por enzimas de mamífero, los asteriscos indican los intermediarios potenciales que no se acumulan en cantidades detectables en el plasma o en la orina. El esquema fue tomado de Borges y cols., (2018).

La cantidad total de metabolitos excretados en orina podría correlacionarse, con la máxima concentración en el plasma. Las concentraciones halladas en la orina son de 0,5-6% para algunas catequinas del té, de 2-10% para las catequinas del vino y de hasta un 30% para la Epi del cacao en humanos (Quiñones, *et al.*, 2012).

### Epi como potencial tratamiento terapéutico

El consumo de productos de origen del cacao se ha asociado con una disminución del 40% de riesgos cardiovasculares (Yuan, *et al.*; 2017; Quiñones, *et al.*; 2012). Epi, un flavonol que podemos encontrar en el cacao, ha mostrado múltiples beneficios en la salud tanto de modelos

murinos como en humanos (Ottaviani, *et al.*, 2016; Shay, *et al.*, 2015); Yamazaki y cols., (2014). En el músculo cardíaco, Epi disminuye el número de vasoconstricciones en ratones nulos para el gen delta sarcoglicano, disminuyendo la fibrosis en un 13.47% e incrementa el grosor de la pared ventricular del corazón sin aumentar el peso de los ratones, por Western blot se mostró que incrementa el nivel de PI3K, Akt, mTOR y de p70S6k (De Los Santos, *et al.*, 2018), e induce el crecimiento del corazón de forma fisiológica, reduciendo los niveles de ANP y de BNP, marcadores de insuficiencia cardíaca (De Los Santos, *et al.*, 2017). También, un tratamiento de 10mg/kg en un modelo de rata con isquemia inducida, preserva las características funcionales del corazón si se administra Epi antes iniciar con la perfusión; por su parte, Nogueira y cols. (2011) mostraron que Epi en combinación con el ejercicio presenta un efecto sinérgico; ya que después de 10 días de tratamiento se generó, también, protección al daño al miocardio por perfusión.

En el músculo esquelético, Epi es capaz de mediar *in vivo* en humanos la vasodilatación (Ottaviani, *et al.*, 2011), incrementar la densidad capilar, sin alterar la capacidad contráctil, e incrementar la resistencia a la fatiga en un 30%, y el número de mitocondrias en un 10% respecto al control, incluso comparable a lo generado por el ejercicio, en los músculos cuádriceps, y plantaris de ratón (Nogueira, *et al.*; 2011).

El efecto de Epi es mantenido incluso después de 14 días sin ejercicio, Hüttemann y cols. (2012) mostraron que mientras el ejercicio por sí sólo incrementa los niveles de la citrato sintasa en un 6%, sin entrenamiento regresa a un nivel basal; el tratamiento con Epi mantiene el nivel elevado de esta enzima, así como el de la citocromo sintasa en un 85% en comparación con el control, en el músculo cuádriceps de ratón.

El efecto del tratamiento con Epi también modifica la morfometría del músculo, incrementando el área de las fibras, ya sea con entrenamiento o sin entrenamiento interrumpido, en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y plantaris en modelo murino (Lee, *et al.*, 2015).

Molecularmente, el tratamiento de 7 días con Epi en ratones envejecidos se ha observado que disminuye los niveles de miostatina en plasma en un 21%, e incrementa folistatina en un 56%; en el caso de ratones jóvenes se mostró que Epi es capaz de incrementar en un 16% los niveles de miogenina y en un 19% los de MyoD, en el músculo cuádriceps (Gutierrez-Salmean, *et al.*, 2014).

También se ha reportado en un modelo de distrofia muscular, con ratones deficientes para el gen  $\delta$ - sarcoglicano, que el tratamiento de Epi 1mg / kg (cada 12h) mejora el equilibrio de óxido/reducción, incluyendo proteínas relacionadas con la función mitocondrial, y disminuyendo la fibrosis tanto en el músculo esquelético, como cardíaco (Ramirez-Sanchez, *et al.*, 2014; McDonald, *et al.*, 2021; Taub, *et al.*, 2013).

Por su parte, Ramírez y cols. (2013), observaron que en pacientes con diabetes tipo 2 y en ratones con una dieta alta en grasa, ambos con niveles muy elevados de especies reactivas de oxígeno, el tratamiento con Epi en combinación con el ejercicio incrementó de manera significativa las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa), además de funcionar como un estimulante angiogénico, dos veces más elevado en los músculos aerobios.

Estos son sólo algunos ejemplos de la actividad de Epi en diferentes modelos con miopatía, sin embargo, no se sabe con exactitud el efecto que tiene Epi de acuerdo al metabolismo muscular, ni de acuerdo a un daño inducido por quimiotoxicidad, el cual es agudo y transitorio, por lo que es interesante llevar a cabo esta evaluación y poder discernir cuál es la vía que sigue la reparación del músculo gastrocnemio (con características oxidativas) y Tibial anterior (con características glucolíticas).

## JUSTIFICACIÓN

---

La administración de (-)- Epicatequina ha mostrado tener un efecto que promueve la mejora en diversas miopatías como la distrofia muscular, sarcopenia, caquexia, por mencionar algunas; sin embargo, no se ha caracterizado por completo el efecto de Epi en un daño agudo inducido, ni si este efecto es distinto de acuerdo con el metabolismo del músculo. Estos estudios permitirán entender mejor la modulación de Epi en el proceso de reparación muscular con el fin de utilizarlo en potenciales tratamientos para distintos tipos de miopatías.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

¿Mejorará el tratamiento de (-)- Epicatequina la reparación del músculo esquelético con diferentes características metabólicas, Tibial anterior y gastrocnemio, después de una lesión con BaCl<sub>2</sub>?

## HIPÓTESIS

---

(-)- Epicatequina promueve y acelera la reparación del músculo esquelético de los ratones dañados con BaCl<sub>2</sub> a través de un incremento en los niveles de proteínas miogénicas y de  $\beta$ -catenina activa.

## **OBJETIVOS**

---

### **GENERAL**

Evaluar el efecto del flavonol (-)- Epicatequina sobre la reparación del músculo esquelético con dos diferentes tipos de metabolismo, oxidativo y glucolítico, después de generar daño químico por BaCl<sub>2</sub>

### **PARTÍCULARES**

- Generar daño químico a los músculos tibial anterior y gastrocnemio mediante la aplicación de BaCl<sub>2</sub> al 1.2%, identificado por la presencia de tejido granular y necrosis celular.
- Determinar el efecto de Epi sobre la reparación del músculo esquelético a través del análisis del área de daño generado previamente.
- Determinar con distintas tinciones histológicas el tamaño de las fibras, número de núcleos centrales, fibrosis y tipo de fibras, de los músculos tibial anterior y gastrocnemio.
- Analizar los factores de regulación miogénica: miostatina, MyoD y miogenina, en los músculos aislados, así como la participación de la  $\beta$ -catenina (activa) durante la reparación del musculo esquelético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Modelo animal

Para cumplir con el objetivo principal se emplearon ratones machos de 10 semanas de edad de la cepa CD1 (*Mus musculus domesticus*) proporcionado por el Bioterio de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Todos los ratones fueron mantenidos a una temperatura de 26°C, recibieron alimentación *ad libitum* con croquet chow, y ciclos de luz y oscuridad correspondientes a 12h cada uno.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo los lineamientos de la World Medical Association (Declaration of Helsinki) y la Guía para el Cuidado y uso de animales de laboratorio del Institute of Laboratory Animal Resources (<http://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>), aprobado en México por la National Academy of Medicine y en acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El modelo presentado tiene la característica principal de ser una cepa de ratones no consanguínea, lo cual nos permite una amplia variabilidad genética, importante en la elaboración de estudios donde se pretende generar tratamientos farmacológicos.

Los músculos analizados fueron el Tibial anterior y el gastrocnemio, dos músculos con características metabólicas diferentes, siendo el primero más glucolítico y el segundo, oxidativo; lo cual nos permitió conocer la respuesta que tiene Epi en dos microambientes diferentes.

A continuación, se presentan las características estructurales y metodológicas de cada músculo evaluado.

## Tibial anterior

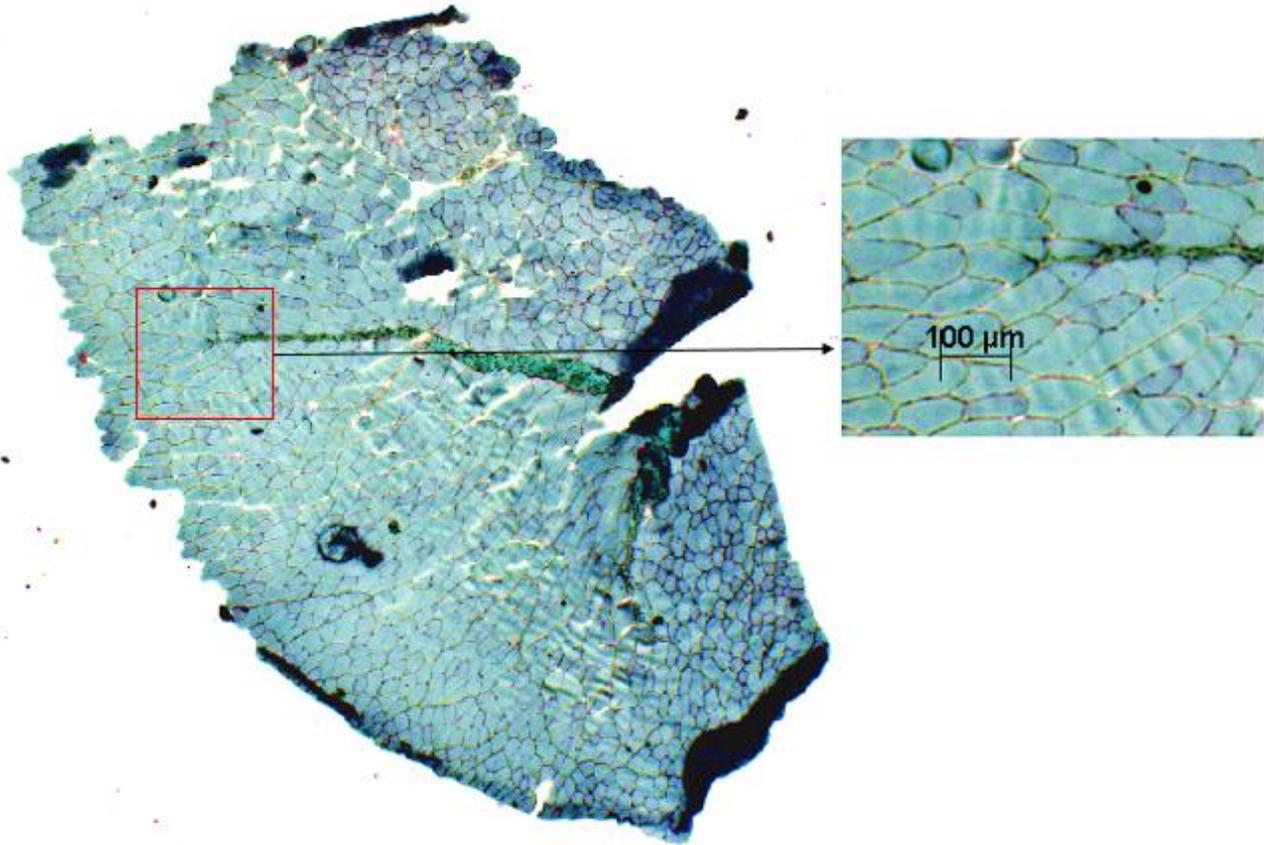
Para los análisis llevados a cabo en el músculo Tibial anterior (TA), se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de 10 semanas de edad, 6 ratones para cada grupo, en cada uno de los experimentos, excepto para los Westerns blots en los cuales se usaron 12 ratones por grupo.

El músculo TA presenta una prevalencia de fibras tipo 2 en un 99% como se presenta en la Tabla 1 (Bloemberg & Quadrilatero, 2012). En el corte transversal teñido con tricrómico modificado de Gomori, se aprecia de color azul a las fibras tipo II, y de color rojo a las fibras tipo I (Figura 4).

**Tabla 1. Caracterización del tipo de fibras que presenta el TA.**

Músculo de ratón		Tipo de fibras							
		Fibras contadas	Tipo I	Tipo I/IIA	Tipo IIA	Tipo IIAX	Tipo IIIX	Tipo IIIXB	Tipo IIB
Tibial anterior roja	Población (%)	857±50	0.6±0.6	0	18.2±2.4	8.3±0.5	44.7±1.9	3.0±0.5	25.1±1.6
Tibial anterior blanca	Población (%)	600±59	0	0	0.6±0.3	4.4±0.5	16.3±1.7	7.7±1.2	70.9±1.8

Tabla modificada de Bloemberg, 2012 (Bloemberg & Quadrilatero, 2012).



**Figura 4 Microfotografía de una sección transversal del músculo Tibial anterior sin daño y sin Epi, teñido con tricrómico modificado de Gomori.** Corte transversal del músculo TA SD-E observado con el objetivo de 2.5x, se aprecia que dicho músculo se encuentra constituido por fibras tipo II (color azul), de metabolismo glucolítico.

## **Gastrocnemio**

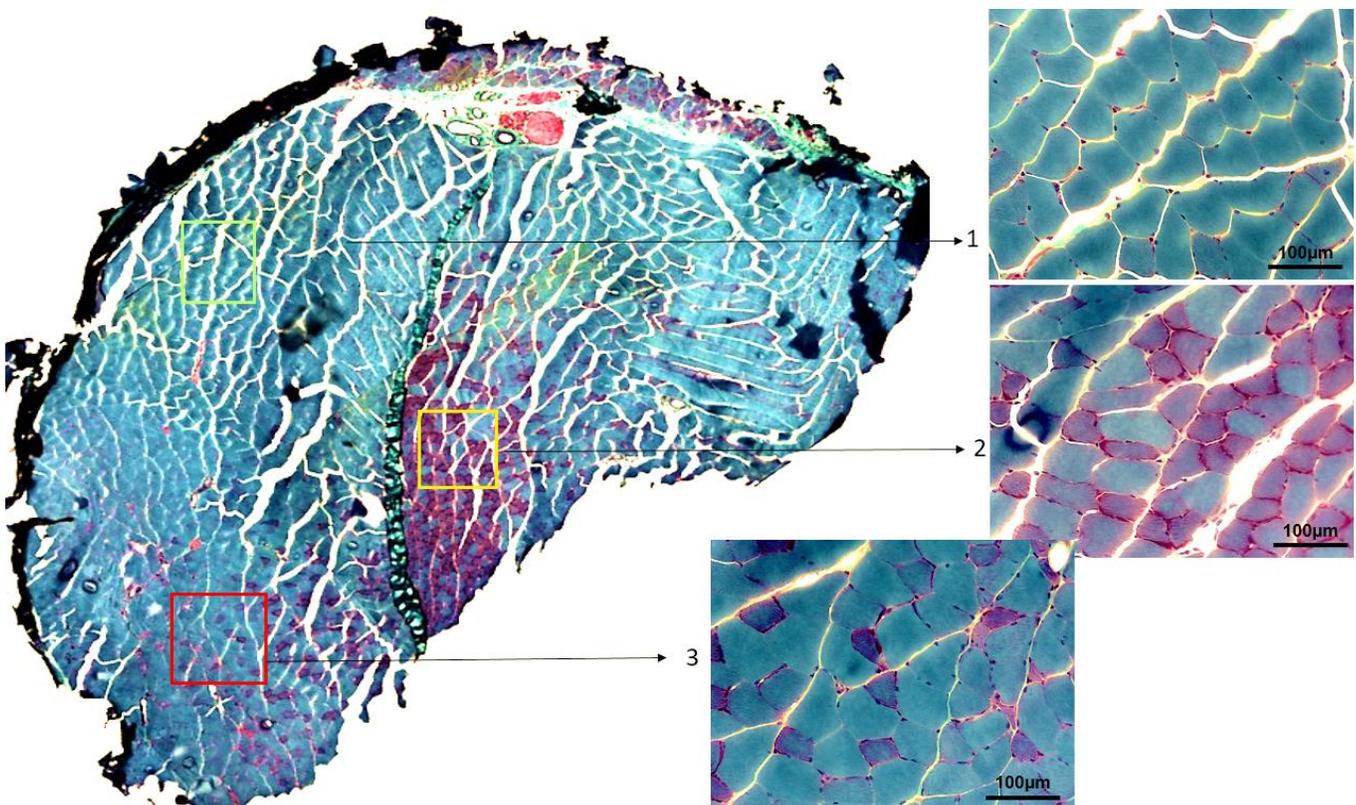
Para los análisis llevados a cabo en el músculo gastrocnemio se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de 10 semanas de edad, 3 ratones para cada grupo, en cada uno de los experimentos, excepto para los Westerns blots en los cuales se usaron 6 ratones por grupo.

Presenta una composición heterogénea (Tabla 2), con alrededor de 84% de fibras tipo II y de un 16% de fibras tipo I (Figura 5).

**Tabla 2. Caracterización del tipo de fibras que presenta el músculo gastrocnemio**

Músculo de ratón Gastrocnemio		Tipo de fibras							
	Fibras contadas	Tipo I	Tipo I/IIA	Tipo IIA	Tipo IIAX	Tipo IIX	Tipo IIXB	Tipo IIB	
Rojo (2)	Población (%)	681±63	7.9±0.5	0.2±0.1	41.6±1.3	5.0±0.4	19.6±2.1	3.6±0.4	22.2±1.1
Heterogéneo (3)	Población (%)	576±68	0	0	20.9±1.6	3.6±0.4	14.8±1.1	4.9±0.8	55.7±1.4
Blanco (1)	Población (%)	669±101	0	0	0	0	1.6±0.6	1.5±0.4	97.0±0.8

Tabla modificada de Bloemberg & Quadrilatero (2012).



**Figura 5. Microfotografía ilustrando un corte transversal de un músculo gastrocnemio sin daño y sin Epi teñido con tricrómico modificado de Gomori. Corte transversal del músculo gastrocnemio, se observa de color azul a las fibras tipo II, y de color rojo a las fibras tipo I; así como las 3 regiones características de este tejido: 1. Blanca, con prevalencia de fibras tipo II; 2. Roja, con prevalencia de fibras tipo I; y 3. Heterogénea, con ambos tipos de fibras.**

## Diseño experimental

Con el fin de examinar los efectos de Epi sobre los músculos Tibial anterior (TA) y gastrocnemio dañados con BaCl<sub>2</sub>, se realizaron 4 grupos por cada tiempo (con un número de individuos de  $n=6$  y  $n=3$  animales por grupo, respectivamente para cada músculo): el grupo dañado con BaCl<sub>2</sub> y sin tratamiento (CD -E), el grupo dañado y con tratamiento (CD+E), el grupo sin daño y administrado sólo con agua y DMSO al 0.2% (SD-E), y el grupo sin daño y con tratamiento (SD+E).

A las 10 semanas de edad, la pierna derecha de los ratones a nivel del TA y gastrocnemio, fue lesionada con 50 µl de BaCl<sub>2</sub> al 1.2%, inyectado en 5 puntos equidistantes. Una hora después del daño, los ratones fueron tratados con el vehículo (agua + DMSO al 0.2%) o con Epi 1 mg/kg (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, con el  $\geq 97\%$  de pureza), disuelta en agua + DMSO al 0.2%, este tiempo corresponde al tiempo 0h. La administración del vehículo o de Epi fue por vía intragástrica con una cánula, cada 12h hasta el momento del sacrificio.

Después del tratamiento, los ratones fueron sedados con Ketamina 80 mg/kg (ketamine hydrochloride 200 mg/mL), y Xilacina 10 mg/kg (xylazine hydrochloride 20 mg/mL) administrado vía intraperitoneal; posteriormente, fueron sacrificados por dislocación cervical.

Los músculos de cada ratón fueron colectados y usados para el análisis histológico, bioquímico y molecular en diferentes tiempos 0h (1 h después del daño), 12 h y 1 día después del daño; con el fin de evaluar el efecto de Epi en la estructura morfológica del músculo se decidió analizar los músculos a las 2, 4 y 15 días posteriores a daño.

## Modelo de daño muscular con BaCl<sub>2</sub>

El cloruro de bario ha sido utilizado como agente que daña el músculo esquelético al bloquear los canales de K, incrementar el Ca<sup>2+</sup> y generar mionecrosis, a través de una prolongada despolarización de las miofibras (Jung, *et al*; 2019), así como generar pérdida de las uniones neuromusculares y perfusión capilar, efectos observados desde la primera hora de exposición (Morton, *et al*; 2019). Murphy y cols. (2011), observaron que el daño muscular con BaCl<sub>2</sub>, genera

hipercontracción de la miofibra y su muerte, sin afectar a las poblaciones mononucleares, ni a las células satélites o a los fibroblastos; así mismo, observaron que los fibroblastos aislados expresan Tcf4 y colágena VI, factores importantes durante la muerte celular por apoptosis y en la reconstitución de la matriz extracelular durante la reparación muscular (Urciuolo, *et al*; 2013).

Antes de generar el daño por BaCl<sub>2</sub> todos los animales fueron anestesiados con ketamina (PiSA) 80 mg/kg y xilacina (PiSA) 5mg/kg inyectado vía intraperitoneal; posteriormente el daño fue generado con 50 µl de BaCl<sub>2</sub> (~57mM) al 1.2% en agua estéril y desionizada (Sigma Aldrich, MO, USA), se inyectó únicamente la pierna derecha en 5 puntos equidistantes, 10 µl cada punto, con una jeringa de insulina; la pierna izquierda sirvió como control y fue catalogada como el músculo sin daño (SD).

### **Análisis histológico**

Con el fin de evaluar las alteraciones en la estructura del músculo, tanto el TA como el gastrocnemio de las piernas posteriores, derecha e izquierda, fueron disecados y congelados con isopentano enfriado con nitrógeno líquido, posteriormente se realizaron cortes seriales de 7 µm de ancho, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E), y con tricrómico modificado de Gomori (TG) para caracterizar el tipo de fibras presentes en los músculos, fibras rojas= tipo I, fibras azules= tipo II.

### **Análisis morfométrico**

Para el análisis morfométrico se utilizó en todos los casos una sección al mismo nivel de profundidad y se tomaron microfotografías de toda el área, los cortes fueron observados a una amplificación de 10x y con el programa AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 se analizó el área de las fibras de cada músculo, para lo cual se tomaron al azar 200 fibras.

Para el porcentaje de núcleos centrales se contaron todas las fibras con núcleos al centro con respecto al total de las fibras, con el software "ImageJ".

El porcentaje de área de daño fue considerado como el total de área que presentaba tejido granular con respecto al área total, esto fue realizado en la misma sección empleada para la medida del área de las fibras y los núcleos centrales.

### **Análisis molecular por Western blot**

Aproximadamente 50mg de músculo del TA o del gastrocnemio fueron homogenizados en una solución de buffer de lisis NP-40 (Tris HCl 50mM, NaCl 150mM, Igepal al 1%) suplementado con una mezcla de cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Fisher # A32959).

La concentración de proteína total fue obtenida a través del método de Bradford, posteriormente 50 µg de proteína fue cargada en un gel SDS-PAGE de tipo desnaturante al 10% y electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm<sup>2</sup>, Pierce, P01-88018).

Las membranas fueron incubadas por 1 h en solución de bloqueo (leche baja en grasa al 5% en TBS con Tween 20 al 0.05% (TBS-T), continuando con una incubación por 14 h a 4°C con el anticuerpo primario apropiado, utilizado de acuerdo con las especificaciones del fabricante: GAPDH (1:3000 Thermo Fisher # MA5-15738), β-Catenina (1:800 Cell Signaling #88145), Miostatina (1:500 Thermo Fisher # PA5-11936), MyoD (1:500 Thermo Fisher # MA1-41017), Miogenina (1:200 Thermo Fisher # F5D).

Posteriormente las membranas fueron lavadas (3 veces, 5 min cada una) con TBS-T 0.05% y se colocaron en incubación con el anticuerpo secundario- HRP: Anti Mouse 1:10000 (Jackson #715-035-150) o Anti rabbit 1:10000 (Cell Signaling #7074s) por una hora.

La detección de las proteínas de interés fue realizada con SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate kit (34095, Thermo Scientific), y el análisis cuantitativo fue realizado con el programa LI-COR Image Studio™ ([http://www.licor.com/bio/products/software/image\\_studio\\_lite/](http://www.licor.com/bio/products/software/image_studio_lite/)).

## **Análisis estadístico**

Todos los valores obtenidos serán expresados como media  $\pm$  SEM, el análisis se llevó a cabo a través del programa GraphPad Prism 7.

La distribución de los datos fue probada a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov test. De acuerdo a los datos se emplearon las pruebas de Mann Whitney, o ANOVA de dos vías, con el fin de determinar las diferencias entre los grupos se usaron pruebas post hoc, las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas cuando el valor de P fue  $< 0.05$

## RESULTADOS

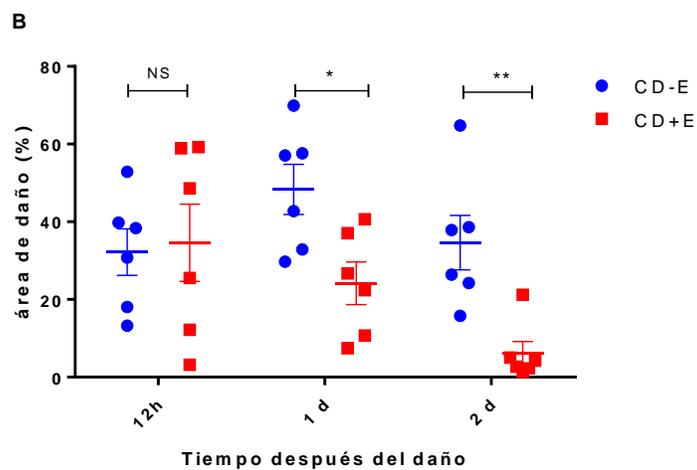
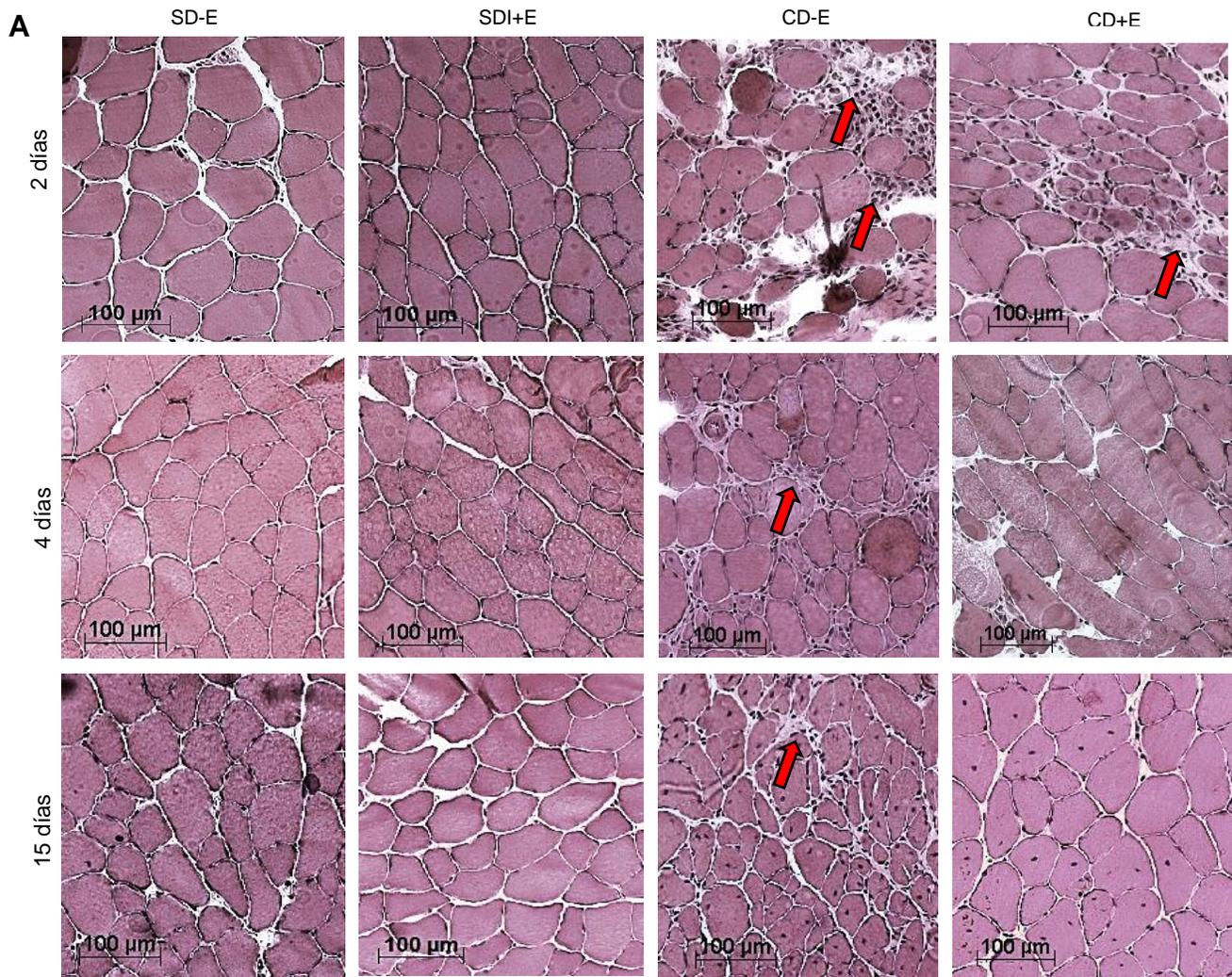
---

### **Epi promueve la reparación del músculo Tibial anterior**

El objetivo de la presente tesis fue evaluar el efecto de Epi sobre la reparación de dos músculos metabólicamente diferentes, por lo que en un principio se decidió estudiar al músculo Tibial anterior (predominantemente glucolítico) y al músculo gastrocnemio (predominantemente oxidativo) de acuerdo con Hardy y cols. (2016), la evaluación se planteó hacerse sólo a los 2, 4 y 15 días después del daño, ya que es el momento en el que se observa una mayor cantidad de células satélites activas. Sin embargo, después de observar que el efecto de Epi comienza antes de los dos días (Figura 6A); decidimos evaluar tiempos menores: 1 hora después del daño (0h), 12h y un día después del daño (Figura 7).

El músculo sin daño (sin tratamiento, y con tratamiento), presenta una estructura homogénea con fibras poligonales, dispuestas en mosaico y con núcleos en la periferia; dichas características se mantienen en todos los tiempos. Por otra parte, para los grupos con daño, se puede observar pérdida de la estructura muscular.

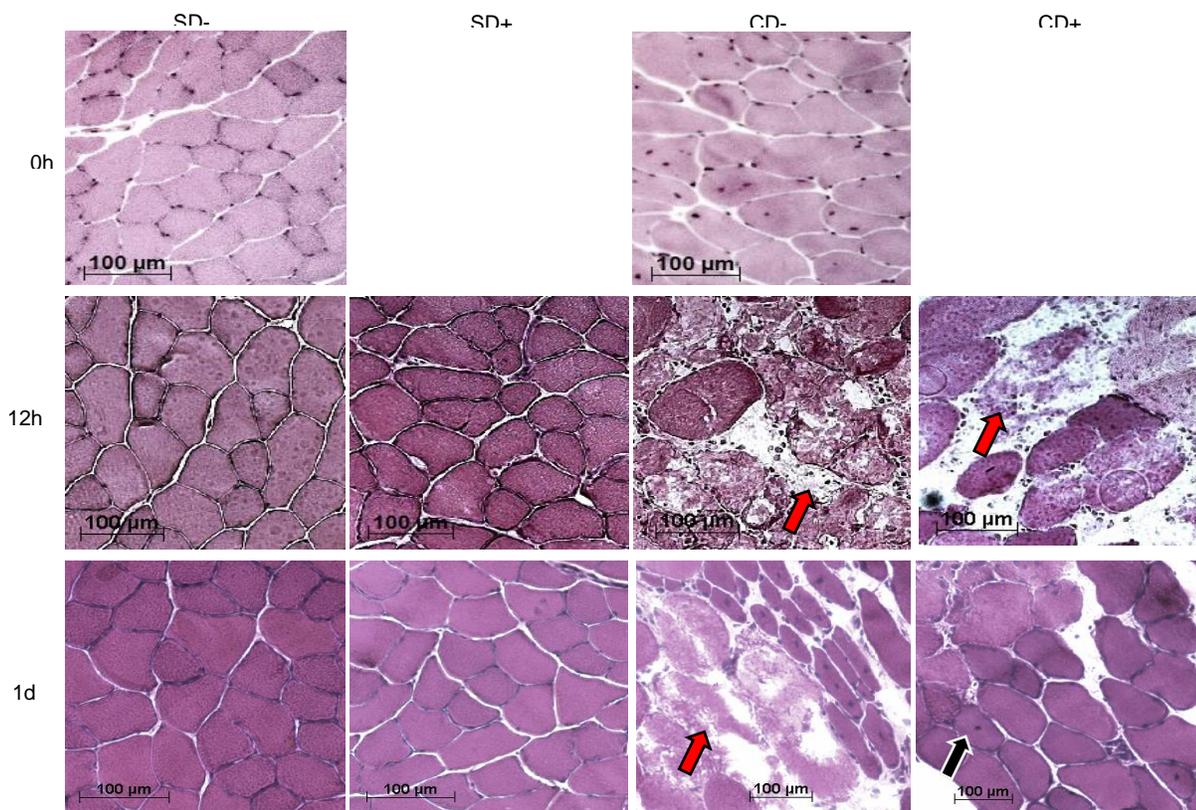
A los dos días después del daño la infiltración de tejido granular es mayor para el grupo que no recibió tratamiento, mientras que en el grupo con tratamiento se manifiestan signos de reparación muscular, presentándose fibras con núcleos centrales, señal de adición celular. Posteriormente a los 4 días después del daño, aunque para los grupos CD-E y CD+E aún se observan áreas de daño, es factible observar que en el grupo con Epi tiene una menor área con necrosis e inflamación. Finalmente, a los 15 días se observa en ambos grupos la presencia de núcleos centrales, aunque claramente en el grupo que no recibió tratamiento las fibras son más pequeñas que los músculos de los animales que recibieron Epi (Figura 6B).



**Figura 6. Epi disminuye el área de daño desde el primer día después del daño. A.** La tinción con Hematoxilina e Eosina muestra que en el músculo dañado hay pérdida de la estructura muscular e infiltración de tejido granular (flecha roja). **B.** Los ratones con daño y con Epi (CD+E)

mostraron menos área de daño desde el día uno \* $p=0.014$ , después de dos días, la reducción del daño fue más contundente, ya que se reduce a una tercera parte con respecto al día previo \*\* $p= 0.0042$  en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento. Todos los datos son presentados como media  $\pm$  EE y fueron analizados por ANOVA de dos vías, posteriormente por comparaciones múltiples con la prueba de Sidak,  $n=6$  por grupo.

Después de analizar el área de cada ratón, se observaron diferencias importantes entre los grupos con daño y con tratamiento (CD+E) desde el primer día, el cual disminuye aproximadamente a una tercera parte con respecto al control con daño CD-E, de  $24.15 \pm 5.5$  y  $48.32 \pm 6.437 \mu\text{m}^2$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ; es interesante observar que el tratamiento de Epi presenta efecto hasta las 24h después del tratamiento, ya que a las 12h no hay diferencias significativas y el daño es heterogéneo para ambos grupos (Figura 6B). Por otra parte, a las 0h el daño no fue observable, por lo que podemos deducir que el efecto del cloruro de bario requiere de más de 1h para generar el daño (Figura 7).

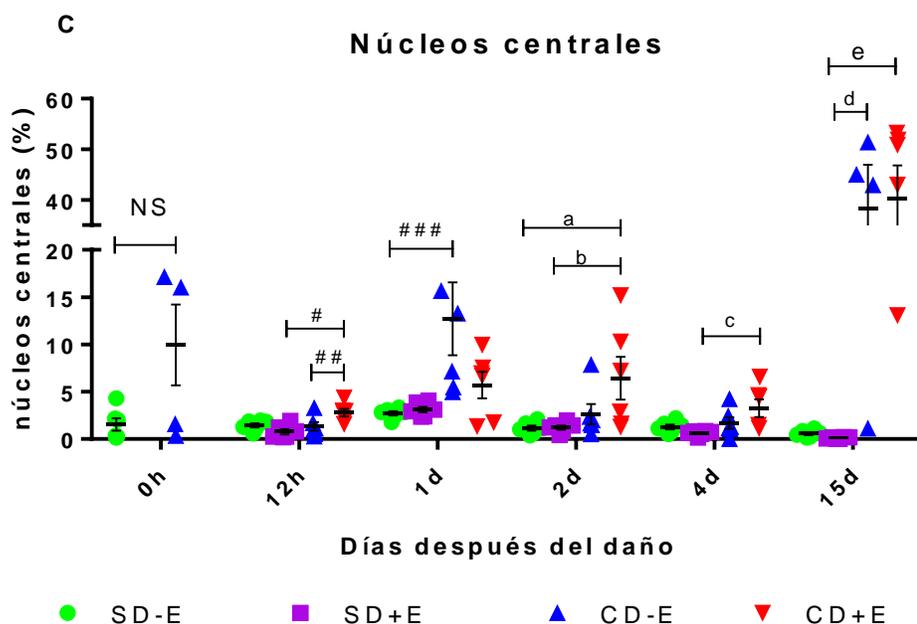


**Figura 7. El área de daño a las 12h no muestra diferencias entre los grupos con daño.** Cortes transversales del TA, teñidos con H y E, no hay presencia de daño a las 0h, a las 12h el área de daño (flecha roja) en la fibra es similar entre los grupos CD; sin embargo, es notorio

que 1d después disminuye el daño y hay presencia de reparación celular, núcleos centrales (flecha negra), en el grupo con daño y tratamiento CD+E.

Los núcleos centrales en las fibras musculares representan la fusión de los mioblastos a las fibras dañadas (Randolph & Pavlath, 2015). Esta característica resulta ser muy útil cuando se requiere evaluar de manera indirecta la reparación del músculo.

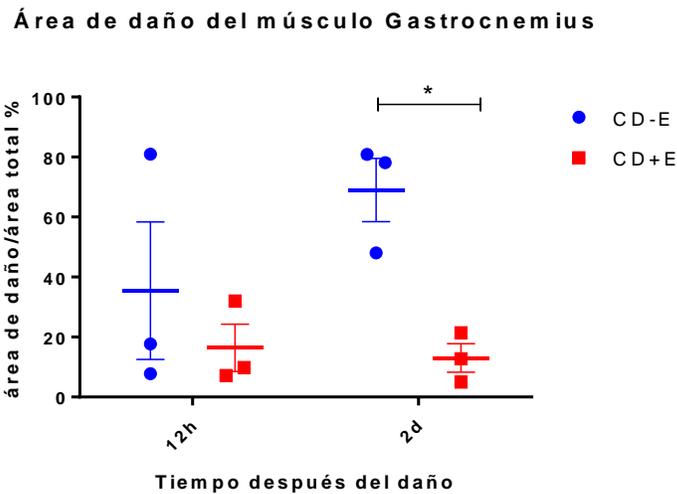
Al hacer la cuantificación de los núcleos centrales con respecto al total de fibras por sección transversal del músculo TA, se pudo observar que durante las primeras 12h después del daño muscular el grupo CD+E presenta mayor cantidad de núcleos centrales con respecto al grupo CD-E de  $2.8 \pm 0.388$  y  $1.332 \pm 0.444$ , respectivamente ( $p = 0.032$ ); mientras que los músculos SD+E presentan menor cantidad de fibras musculares con núcleos ( $0.772 \pm 0.281$ ,  $p = 0.0025$ ). A las 24 horas, los músculos del grupo SD-E presentan menos núcleos centrales en comparación con los ratones CD-E ( $2.712 \pm 0.219$  y  $12.728 \pm 3.852$ , respectivamente;  $p = 0.0174$ ), a los dos días el grupo CD+E muestra una mayor cantidad de núcleos centrales con respecto a el grupo SD-E ( $1.156 \pm 0.263$  y  $6.425 \pm 2.27$ ;  $^a p = 0.0372$ ) y al grupo SD+E ( $1.222 \pm 0.219$  y  $6.425 \pm 2.27$ ;  $^b p = 0.0402$ ); subsecuentemente a los cuatro días hay una mayor cantidad de núcleos del grupo CD+E con respecto al grupo SD+E ( $3.256 \pm 0.934$  y  $0.622 \pm 0.107$ , respectivamente;  $^c p = 0.0076$ ) y finalmente a los quince días entre los grupos SD+E vs. CD-E ( $0.106 \pm 0.04$  y  $38.378 \pm 8.554$ ;  $^d p = 0.0037$ ) y SD+E vs. CD+E ( $0.106 \pm 0.04$  y  $40.26 \pm 6.533$   $^e p = 0.0017$ ) se muestra que la mayor cantidad de núcleos prevalece en las piernas dañadas (Figura 8).



**Figura 8. Porcentaje de núcleos centrales presentados después del daño.** Porcentaje de fibras con núcleos centrales con respecto al total de fibras por sección del músculo TA, a las 12h el grupo CD+E muestra diferencias significativas con respecto a los grupos CD-E y SD+E  $^{##}p=0.03$ ,  $^{\#}p=0.0025$  respectivamente; posteriormente a las 24h el grupo con el tratamiento no continúa incrementando el número de núcleos centrales, manteniendo sólo el grupo CD-E la significancia con respecto al SD-E  $^{###}p=0.0174$ ; a los dos días entre los grupos SD-E vs. CD+E ( $1.156 \pm 0.263$  y  $6.425 \pm 2.27$ ;  $^ap=0.0372$ ) y SD+E vs. CD+E ( $1.222 \pm 0.219$  y  $6.425 \pm 2.27$ ;  $^bp=0.0402$ ); a los cuatro días entre los grupos SD+E vs. CD+E ( $0.622 \pm 0.107$  y  $3.256 \pm 0.934$ , respectivamente;  $^cp = 0.0076$ ) y finalmente a los quince días entre los grupos SD+E vs. CD-E ( $0.106 \pm 0.04$  y  $38.378 \pm 8.554$ ;  $^dp= 0.0037$ ) y SD+E vs. CD+E ( $0.106 \pm 0.04$  y  $40.26 \pm 6.533$   $^ep=0.0017$ ). Todos los datos son presentados como media  $\pm$  SEM, fueron analizados por ANOVA de dos vías, posteriormente por comparaciones múltiples con la prueba de Sidak,  $n=6$  por grupo.

### Epi promueve la reparación del músculo gastrocnemio

A los 2 días de haber generado el daño con  $BaCl_2$ , el músculo gastrocnemio de los ratones con tratamiento con Epi, mostraron una reducción significativa en el porcentaje de área dañada, respecto a aquellos que no recibieron tratamiento de  $69.001\% \pm 10.53$  en CD-E a  $13.054\% \pm 4.756$  para CD+E ( $^*p=0.0366$ ). Sin embargo, antes de las 12h después del daño no hay diferencias significativas, lo cual indica que la acción de Epi es morfológicamente observable posterior a este tiempo (Figura 9).



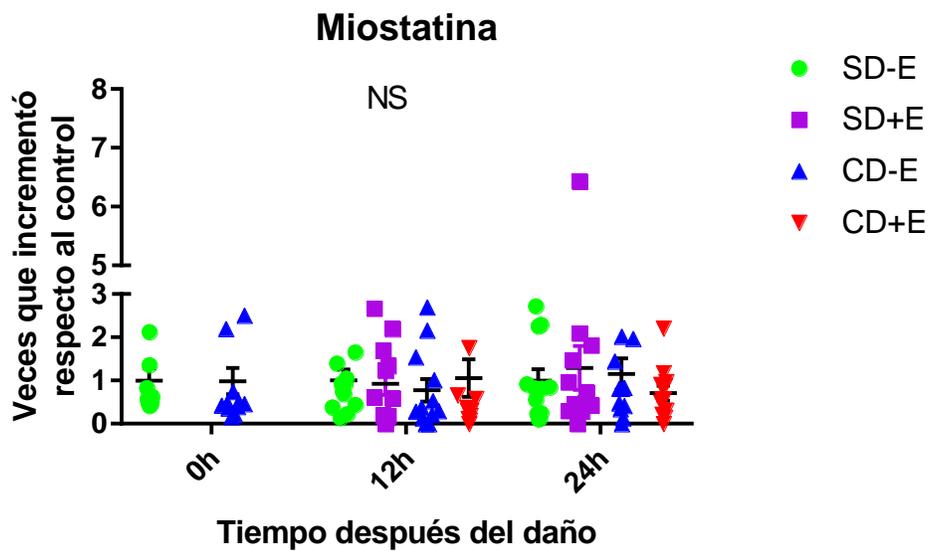
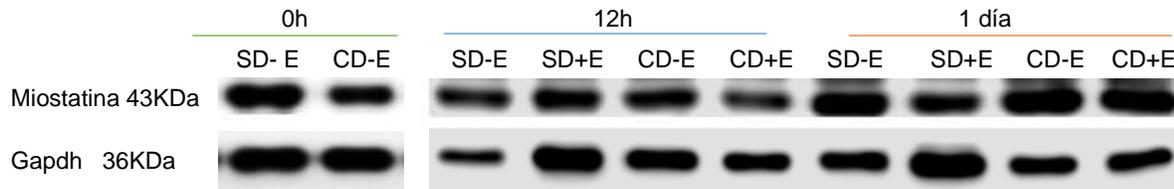
**Figura 9. Epi disminuye el área de daño del músculo gastrocnemio.** Gráfica del área de daño de los grupos con daño, a las 12h no hubo diferencias significativas, sin embargo, 2 días posteriores al daño, el tratamiento con Epi muestra una disminución de 69.001% ± 10.53, para CD-E, a 13.054% ± 4.756 para CD+E, de manera significativa (\*p=0.0366). Todos los datos están expresados como mediana ± SEM, los datos fueron analizados a través de ANOVA de dos vías, y múltiples comparaciones Sidak, n=3 por grupo.

### **Epi no modifica el nivel de proteína de miostatina durante la reparación del músculo Tibial anterior**

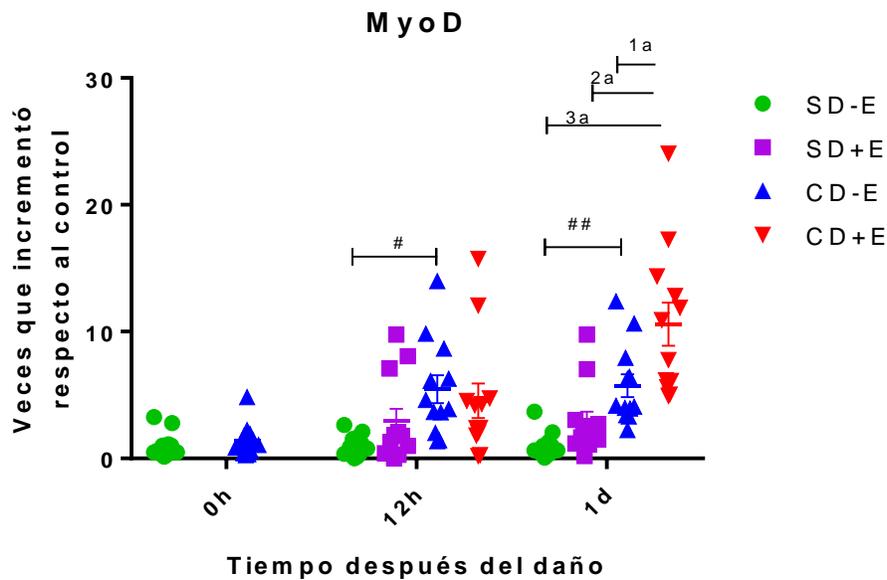
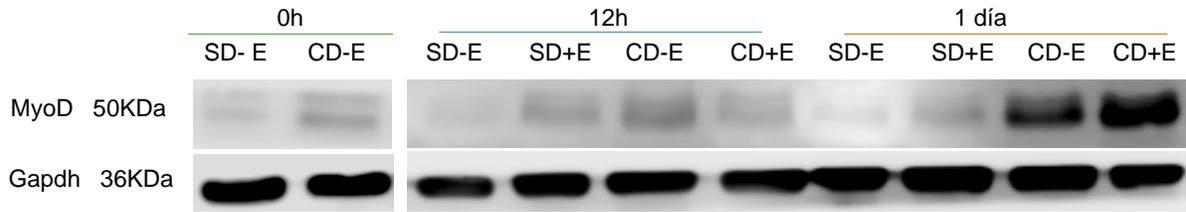
Puesto que el proceso de reparación fue antes de los dos días, decidimos evaluar tiempos previos con diferentes marcadores de crecimiento muscular tal como miostatina, y de miogénesis como miogenina y MyoD a los 0h, 12h y 24h.

En los tiempos señalados después del daño infligido al músculo Tibial anterior, no se observaron cambios significativos en los niveles de miostatina a las 0h, 12h y 1 día entre los grupos, aunque sí un incremento a partir de las 12h (Figura 10). Sin embargo, para el caso de la proteína MyoD se manifiesta un aumento desde las primeras 12 horas después del daño, incrementando de manera significativa en el grupo CD+E a las 24h (Figura 11). Por otra parte, miogenina únicamente incrementa en los grupos con daño; posteriormente a las 24h se observa un repunte en el grupo CD+E (Figura 12). Caso semejante se observó en la proteína  $\beta$ -catenina (activa),

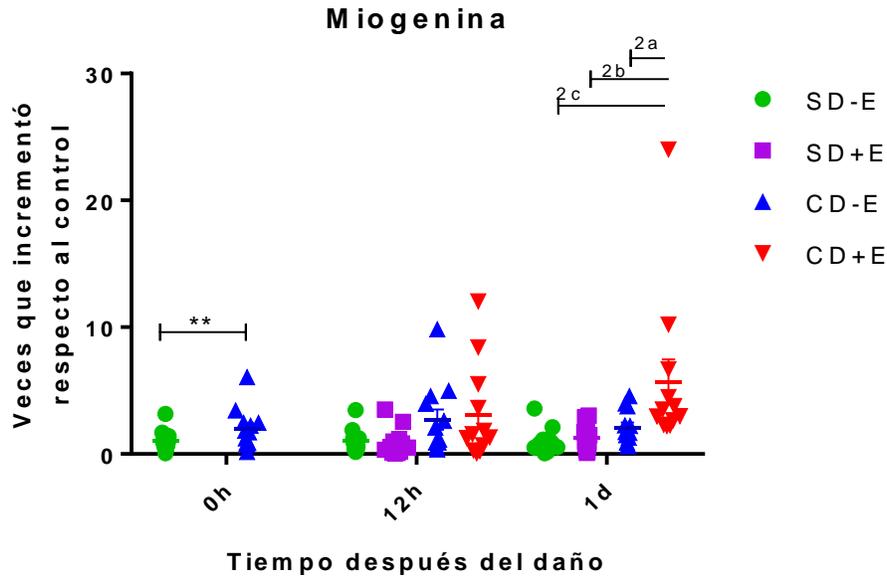
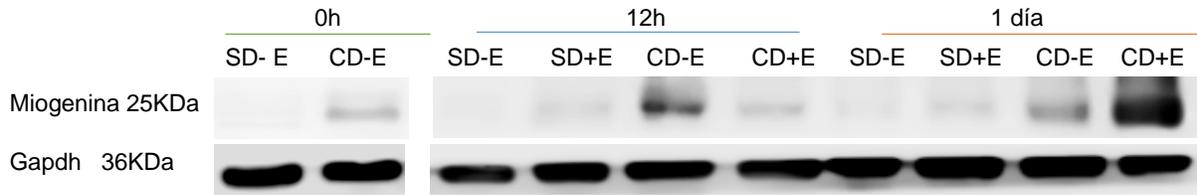
ya que presenta diferencias significativas desde la primera hora después del daño (0h), con el paso del tiempo se hace prominente en el grupo con tratamiento CD+E (Figura 13).



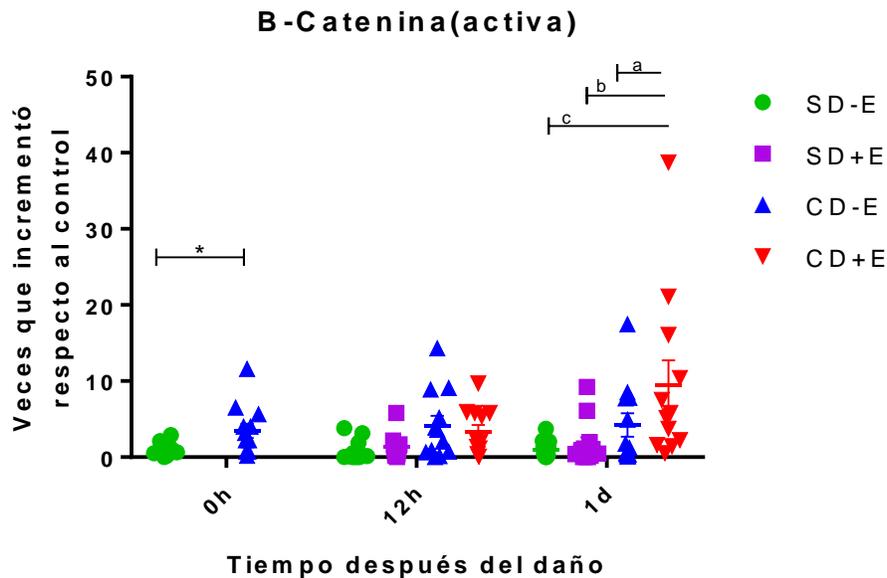
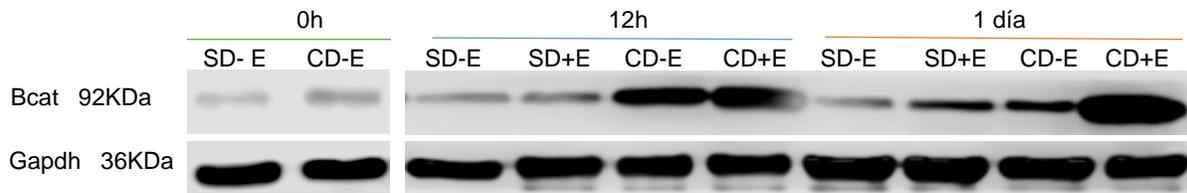
**Figura 10. Miostatina no se modifica significativamente con el tratamiento con Epi en el músculo TA.** Los análisis por Western blot muestran un incremento en miostatina desde las 12h después del daño, sin embargo, no hay diferencias significativas entre los grupos, n=6 por grupo. Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por la prueba de Mann Whitney para los grupos de 0h, y con ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos y tiempos n= 12 por grupo.



**Figura 11. Epi incrementa MyoD después de un día de tratamiento en el grupo con daño en el músculo TA.** El aumento de la proteína MyoD fue significativo a las 12h en el grupo CD-E vs. SD-E (#  $p = 0.015$ ). Posteriormente a las 24h el grupo CD+E presenta una mayor cantidad de proteína comparado con los otros grupos, vs. CD-E, <sup>1a</sup>  $p = 0.0077$ ; vs. SD+ E, <sup>2ap</sup>  $p = 0.0001$ ; y vs. SD-E, <sup>3a</sup>  $p = 0.0001$ . La elevación en la cantidad de proteína, también fue observada en los grupos CD-E vs. SD-E (##  $p = 0.0095$ ). Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por la prueba de Mann Whitney para los grupos de 0h, y con ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos y tiempos  $n = 12$  por grupo.



**Figura 12. Epi incrementa miogenina después de un día de daño en el grupo con daño en el músculo TA.** El aumento en el nivel de proteína de miogenina fue observado desde el tiempo 0h e el grupo con daño (\*\*  $p = 0.044$ ). Posteriormente, esta misma proteína mostró en el día 1, un incremento significativo en el grupo CD+E comparado con los otros grupos (CD-E, <sup>2a</sup>  $p = 0.0142$ ; SD+E, <sup>2b</sup>  $p = 0.0019$ ; and SD-E, <sup>2c</sup>  $p = 0.001$ ). Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por la prueba de Mann Whitney para los grupos de 0h, y con ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos y tiempos  $n = 12$  por grupo.

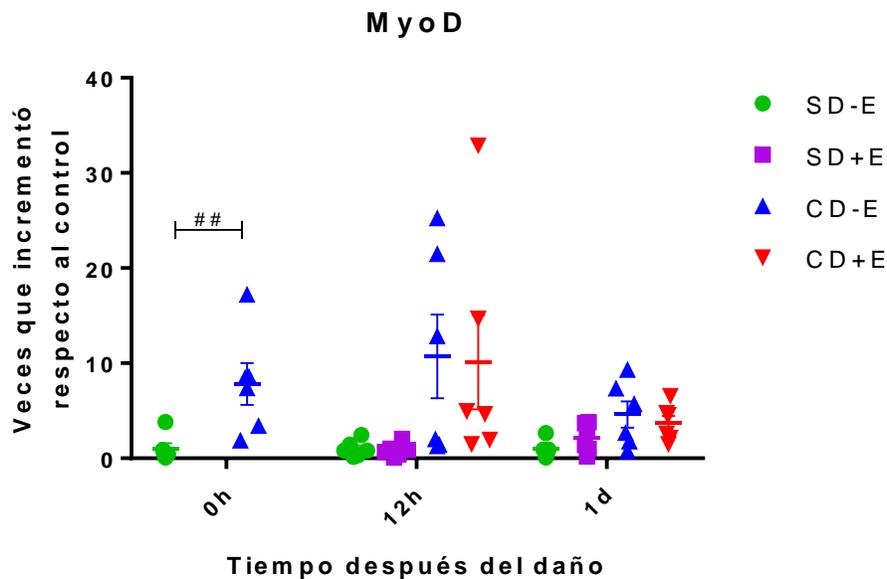
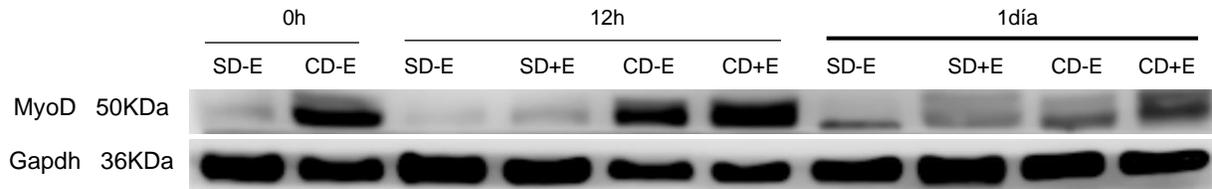


**Figura 13. Epi incrementa  $\beta$ -catenina (activa) después de un día en el grupo con daño en el músculo TA.** El tratamiento con Epi incrementa el nivel de  $\beta$ -catenina, tanto en el músculo lesionado como en el no lesionado, CD+E vs. CD-E (<sup>a</sup>  $p = <0.05$ ), vs. SD+E (<sup>b</sup>  $p = 0.002$ ) y vs. SD-E (<sup>c</sup>  $p = 0.0006$ ). Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por la prueba de Mann Whitney para los grupos de 0h, y con ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos y tiempos  $n=12$  por grupo.

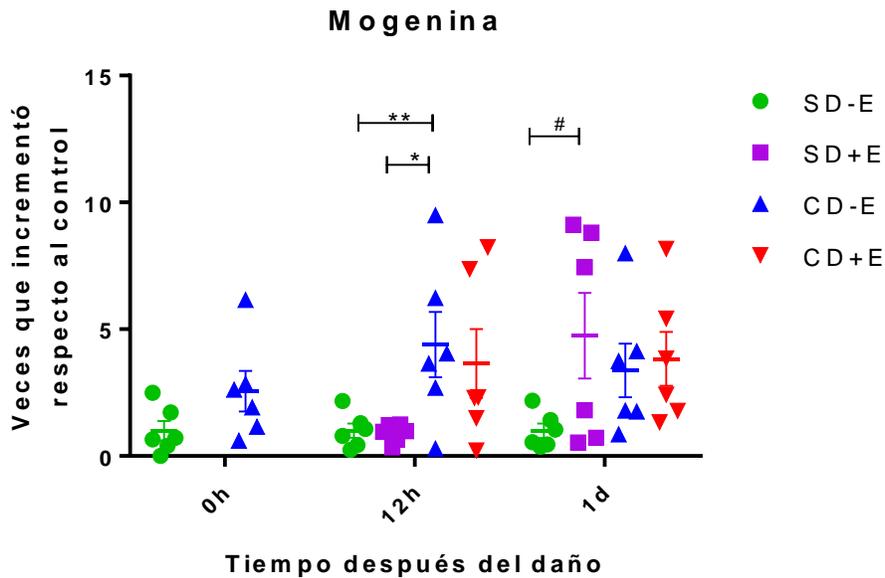
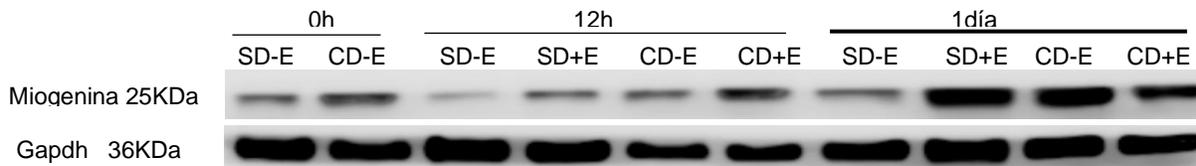
### Epi no modifica los niveles de proteína de $\beta$ - catenina (activa) durante la reparación del músculo gastrocnemio

Después de analizar por western blot los niveles de proteínas, MyoD se observa un incremento significativo desde los primeros tiempos SD-E vs. CD-E  $##p=0.0087$ , a las 12h el nivel de dicha proteína incrementa entre los grupos con daño, aunque no son significativamente diferentes (Figura 14). Para el caso de Miogenina presenta diferencias significativas entre los grupos con daño y sin daño hasta las 12h (SD-E vs. CD-E  $**p=0.0385$ ; SD+E vs. CD-E  $*p=0.0324$ ), este

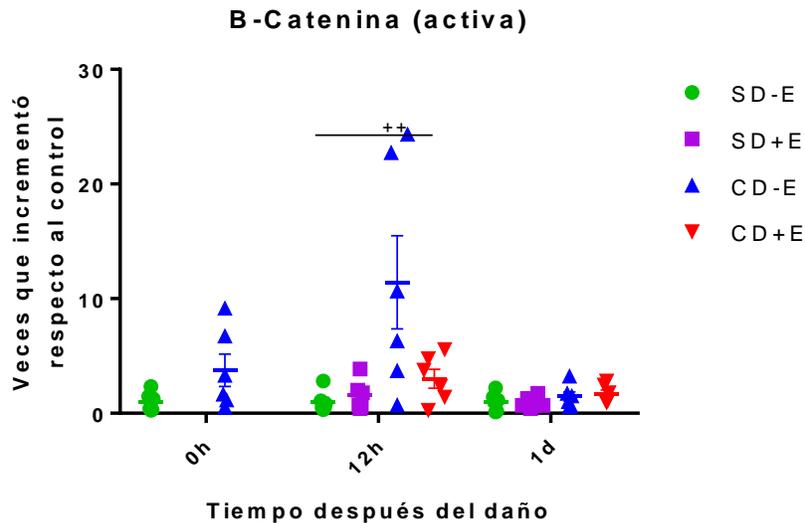
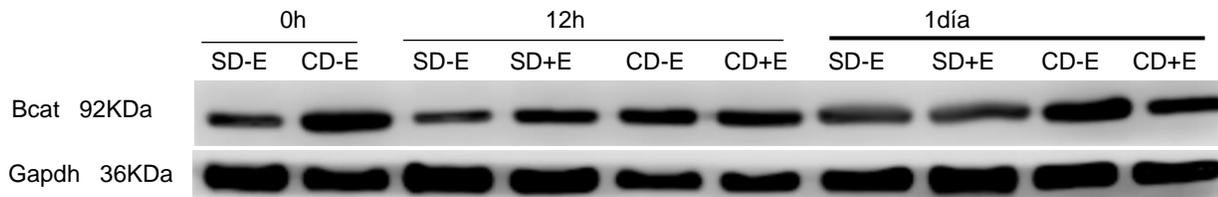
cambio en el nivel de proteína continúa hasta un día después del daño, pero interesantemente para el caso del grupo SD+E muestra un incremento importante con respecto al SD-E #p=0.0215, aproximadamente cuatro veces más (Figura 15). Finalmente, no se observaron diferencias significativas para la proteína  $\beta$ -catenina (activa) a las 0h después del daño, posteriormente a las 12h se observan diferencias solo para el grupo CD-E (\*\*p=<0.004) con respecto a los demás grupos, y un día después no se observan diferencias (Figura 16).



**Figura 14. Epi no modifica MyoD en ninguno de los grupos en el músculo gastrocnemio.** El factor de miogénico MyoD incrementa de forma inmediata a las 0h (SD-E vs. CD-E ## p = 0.0087), y continúa a las 12h, pero no es lo suficientemente grande para ser significativa en el grupo con tratamiento, se presenta de forma constante en el resto de los grupos hasta las 24h después del daño. Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos, n = 6 por grupo.



**Figura 15. Epi promueve una mayor cantidad de miogenina en el grupo SD+E en el músculo gastrocnemio un día después del daño.** Miogenina no muestra diferencias significativas a las 0h, hasta las 12h se observa diferencias entre los grupos CD-E vs. SD-E (\*\* $p=0.0385$ ), y SD+E vs. CD-E (\* $p=0.0324$ ), finalmente, 1 día después del daño, el nivel de miogenina se mantiene en todos los grupos con daño, aunque de manera interesante en el grupo SD+E incrementa con respecto a SD-E de manera significativa # $p = 0.0215$ . Estos resultados muestran que el tratamiento con Epi incrementa los niveles de miogenina en un grupo en el cual no presenta ningún tipo de daño al primer día. Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos,  $n= 6$  por grupo.

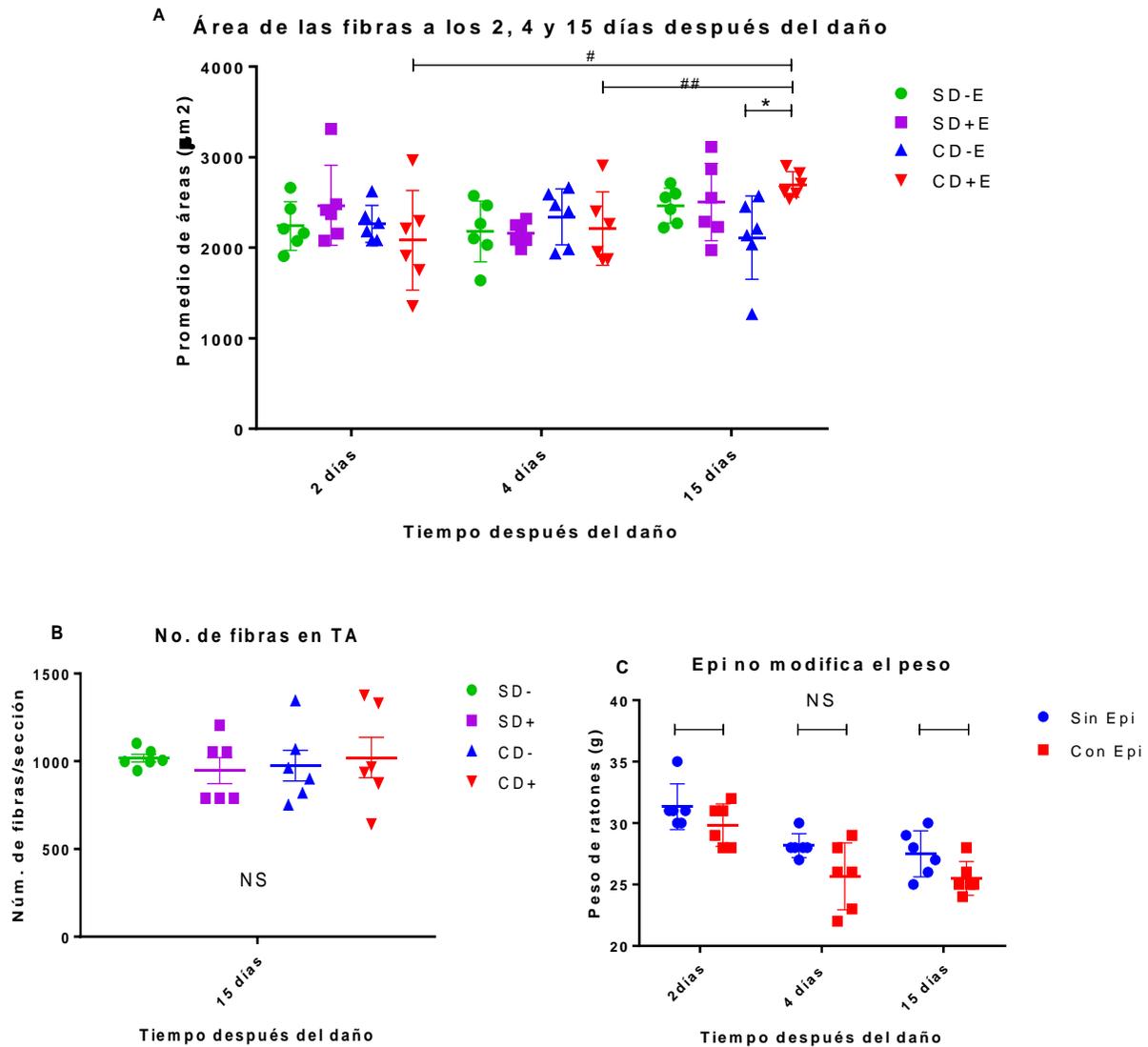


**Figura 16. Epi no modifica los niveles de  $\beta$ -catenina (activa) en el músculo gastrocnemio.** La evaluación por Western blot mostró que no hay diferencias significativas en  $\beta$ -catenina (activa) a las 0h después del daño, posteriormente a las 12h se observan diferencias significativas en el grupo con daño y sin tratamiento CD-E ++  $p < 0.004$ , con respecto al resto de los grupos. Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y fueron analizados por ANOVA de dos vías y pruebas post hoc Tukey HSD para la comparación entre grupos,  $n = 6$  por grupo.

### Epi promueve la recuperación del área de las fibras dañadas a los 15 días del músculo Tibial anterior

En la Figura 6A se muestran los cortes transversales del músculo TA obtenidos en los días 2, 4 y 15 días. Como se había señalado, el proceso de reparación en CD-E fue más lento que el grupo CD+E; después de 4 días se observó aún una gran cantidad de tejido granular en el grupo CD-E. No se observaron diferencias significativas en el área transversal de las fibras ni a los 2, ni a los 4 días, pero a los 15 días las fibras de los músculos dañados y con tratamiento CD+E incrementaron de área de manera significativa (\* $p=0.0243$ , # $p=0051$ , ## $p=0311$ ) con respecto el

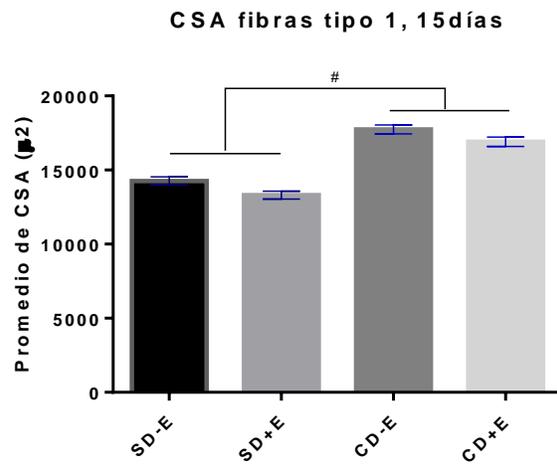
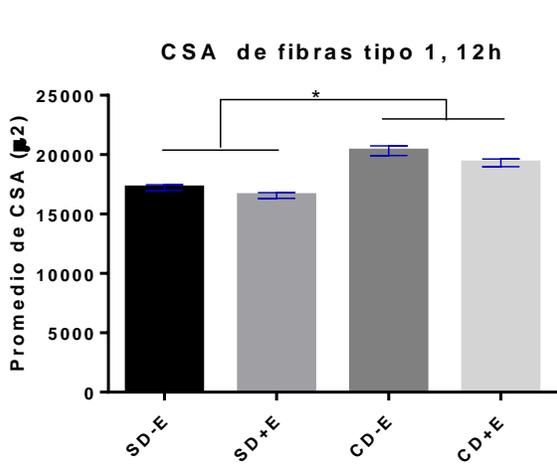
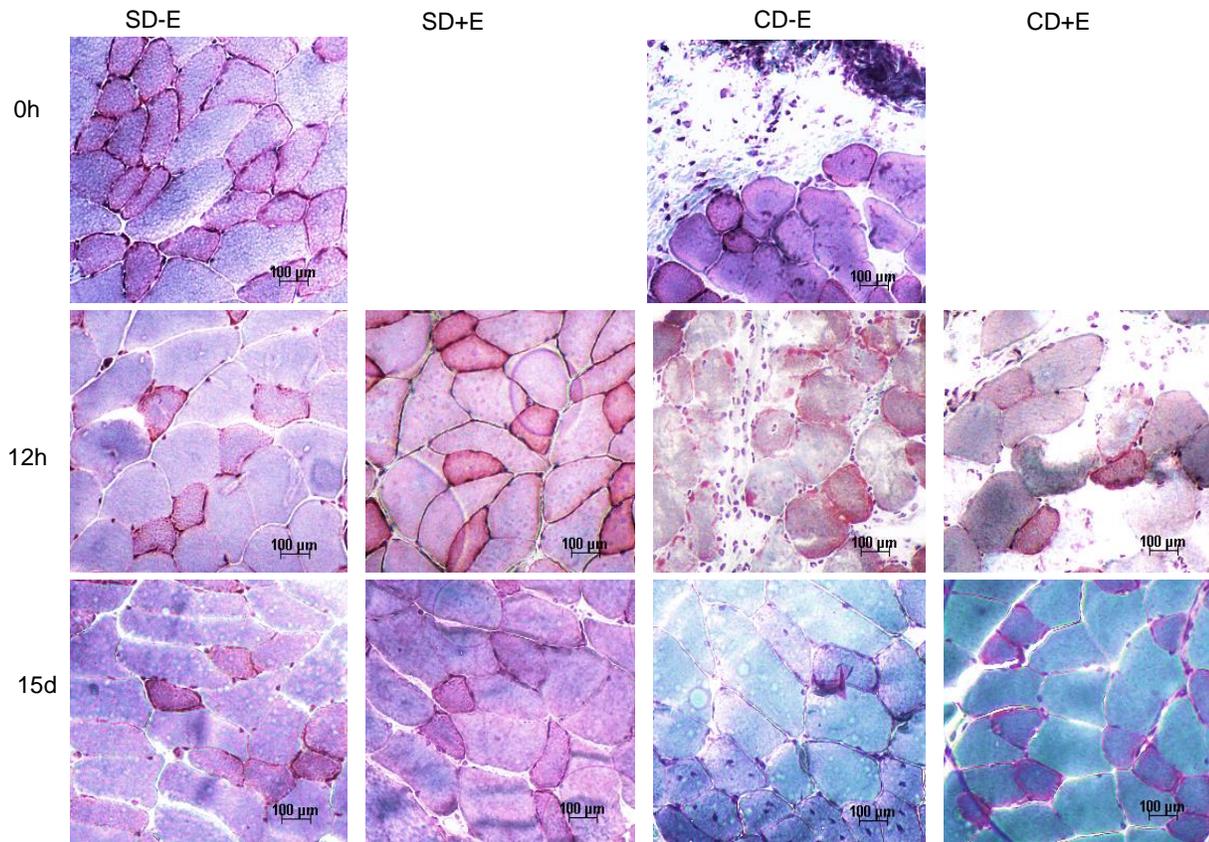
resto de los músculos (Figura 17A). El incremento en el área transversal no se encontró asociado a la adición de mioblastos a la fibra, ni el número de fibras, o en el peso de los animales (Figura 17ByC).

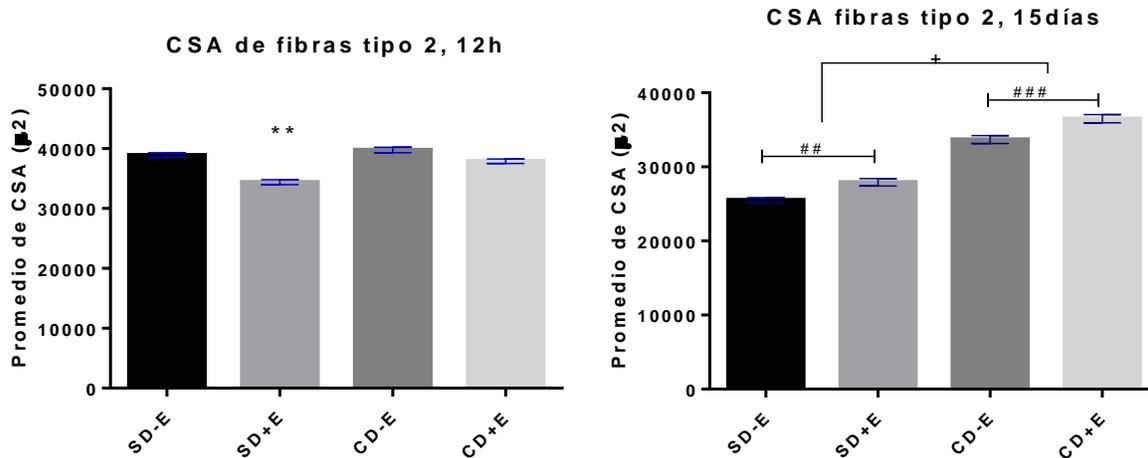


**Figura 17. Epi promueve la recuperación del área del músculo dañado a los 15 días en el músculo TA.** **A.** Gráfica del área de 200 fibras por músculo medidas con Axio Vision a un objetivo de 10x, el grupo que presenta diferencias significativas es CD+E \* $p=0.0243$  con respecto al resto de los grupos a los 15 días, y entre el mismo grupo CD+E en el tiempo vs. 2 y 4 días # $p=0.0051$ ; ## $p=0.0311$ . **B. C.** El conteo total del número de fibras y el peso cada uno de los ratones no mostró diferencias significativas. Todos los datos están expresados como media  $\pm$  SEM, los datos fueron analizados a través de ANOVA con pruebas post hoc para la comparación entre grupos, Tukey HSD,  $n=6$  por grupo.

## **Epi promueve la hipertrofia en las fibras tipo II del músculo gastrocnemio**

La proteína miosina es esencial para la maquinaria que genera la contracción en el músculo esquelético, y existen diferentes isoformas que contribuyen a la diversidad de los diferentes tipos de fibras (Pette & Staron, 2000). Debido a estas características, resulta interesante analizar el efecto de Epi sobre los tipos de fibras musculares. Por lo anterior, se analizó la morfometría del músculo gastrocnemio a través de cortes transversales (CSA  $\mu^2$ ) de las fibras a las 0h 12h y 15 días después del daño, a través de la tinción de tricrómico modificado de Gomori (Figura 18). Después de una hora de haber realizado el daño (0h), no se observaron diferencias significativas en el área transversal de los músculos de los grupos analizados. Sin embargo, a partir de las 12h se observan diferencias de acuerdo al tipo de fibra. Las fibras tipo I (lentas y oxidativas), muestran diferencias entre los grupos SD y CD, pero no entre los grupos con y sin tratamiento, tanto a las 12h como a los 15 días \* $p=0.0001$ , # $p=0.0001$ ; mientras que las fibras tipo II (rápidas y glucolíticas) de los ratones SD+E muestran un área más pequeña a las 12h con respecto a los demás grupos \*\* $p=0.0001$ ; por otro lado, a los 15 días las fibras tipo II muestran diferencias significativas en los grupos tratados, ya que éstas son más grandes que aquellos ratones que no recibieron tratamiento (SD-E vs. SD+E ### $p=0.0115$ ; CD-E vs. CD+E #### $p=0.0003$ ), y entre los grupos con daño y los grupos sin daño (SD vs. CD + $p=0.0001$ ). De nuestros resultados podemos asumir que Epi por sí misma, induce un incremento en el área transversal de las fibras tipo II, pero no en las fibras tipo I del músculo gastrocnemio.





**Figura 18. Epi incrementa el tamaño de las fibras tipo II, del músculo gastrocnemio a los 15 días.** Arriba. Se observa a través de la tinción tricrómico modificado de Gomori el proceso normal de reparación que tiene el músculo gastrocnemio en los músculos dañados, así como las características morfológicas que presentan los músculos sin daño, de color azul se observan a las fibras tipo II, y de color rojo se observan a las fibras tipo I. Abajo. En las gráficas podemos observar que las fibras tipo I, sólo muestran diferencias significativas entre los grupos CD y SD a las 12h \* $p=0.0001$  y a los 15 días # $p=0.0001$ , mientras que las fibras tipo II presentan cambios en el área a las 12h en el grupo SD+E \*\* $p=0.0001$ , las cuales son más pequeñas que las fibras del resto de los grupos; posteriormente a los 15 días después de daño, las fibras tipo II, muestran diferencias con respecto a los grupos con tratamiento, aquellos que recibieron tratamiento con Epi son más grandes que los que no lo recibieron (SD-E vs. SD+E ### $p=0.0115$ ; CD-E vs. CD+E ### $p=0.0003$ , así como entre los grupos CD y SD + $p=0.0001$ ). Todos los datos están presentados como mediana  $\pm$  SEM y fueron analizados por ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de Dunn entre grupos para cada tiempo,  $n=3$  por grupo.

## DISCUSIÓN

---

En este estudio se analizó el efecto de Epi sobre dos tipos de músculo con diferente metabolismo y función, Tibial anterior y gastrocnemio, después de un daño químico agudo a través de la aplicación intramuscular de BaCl<sub>2</sub>.

El daño químico causado por BaCl<sub>2</sub> (Harris & Cullen, 1990); ha sido empleado en múltiples ocasiones para el estudio de diversas fisiopatologías en las que existe alteración de las fibras musculares (Morton, *et al.*, 2019), continuando con una posterior regeneración de las miofibras, sin afectar a las células satélite (Hardy, *et al.*, 2016). En este estudio mostramos que, después del daño químico generado por este compuesto, la reparación es visible desde las primeras 24h para ambos músculos. Para el caso del TA, la activación de ciertos factores como  $\beta$ -catenina y miogenina se dio inmediatamente después del daño, e incluso la reparación del músculo tratado con Epi fue más rápida en comparación con los grupos sin tratamiento; lo cual es interesante ya que, de acuerdo a Liu, y cols. (2013) este tipo de daño presenta la activación de genes asociados en la reparación y en la quimiotaxis hasta después de 36 horas. La relativa rápida acción de la Epi sobre el músculo después de su administración, guarda relación con las concentraciones de Epi y sus metabolitos en plasma, reportados una hora después de su consumo por Kopustinskiene (2015).

Así mismo, el daño agudo que se observa antes de las 12h, presenta un comportamiento similar en los grupos de ratones con tratamiento y sin tratamiento en cada uno de los músculos evaluados. Sin embargo, si se comparan los músculos TA y el gastrocnemio, se puede observar que el músculo gastrocnemio continúa con el aumento en el área de daño, después de las 12h en el grupo sin tratamiento en comparación con el TA, ya que, en este último, el nivel de daño se mantiene con el tiempo. Lo anterior, nos permite proponer que la manifestación de daño

depende el tipo de músculo en estudio. Conviene resaltar que tal diferencia en la reparación de daño ya había sido reportada por otros autores, por ejemplo, Zimowska, y cols. (2008), describieron que después de un daño mecánico por aplastamiento, la miolisis fue más rápida, extensa y heterogénea en el músculo con predominio oxidativo en comparación con músculo más glucolítico. Por lo que la fase de reparación fue más rápida en el músculo glucolítico a los 5 y 7 días que en el oxidativo, el cual tuvo los mayores niveles de reparación hasta el día 14. Esto es importante, ya que, al observar el comportamiento de las proteínas miogénicas en la reparación, vemos que es mucho más drástica su presencia en el TA que en el gastrocnemio.

El daño generado por BaCl<sub>2</sub> induce un proceso inflamatorio de tipo agudo con un pico a las 12h después del daño. La inflamación es un factor importante en la reparación, ya que se ha documentado que la activación de las células satélites depende de las células proinflamatorias tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Ceafalan, *et al.*, 2018; Arnold, *et al.*, 2007). Cuando la inflamación es persistente, incrementa el estrés oxidativo y otros factores que no permiten una adecuada reparación del músculo esquelético, generando de esta forma fibrosis, tal es el caso de las distrofias musculares o incluso el envejecimiento (Preußeb, *et al.*, 2019; Stearns-Reider, *et al.*, 2017; Choi, *et al.*, 2015). Un factor que promueve la inflamación y genera fibrosis es la proteína miostatina, una proteína que pertenece a la familia de TGF- $\beta$  y que afecta de manera negativa el crecimiento muscular (Lee S. J., 2004; Bo Li, *et al.*, 2012; Sharma, 2015). Ante esto, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que Epi disminuye la fibrosis en el músculo esquelético distrófico y promueve la generación de enzimas antioxidantes que reducen el estrés oxidativo (Ramirez-Sanchez, *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio no observamos fibrosis generada debido al daño por BaCl<sub>2</sub>, ni tampoco incremento en los niveles de miostatina en el TA, lo que concuerda con lo reportado por Hardy y cols. (2016), quienes señalan que el daño químico por

BaCl<sub>2</sub> no hay una deposición excedente de matriz extracelular que permita remplazar al tejido muscular, ni una respuesta inflamatoria después de las 18h, por lo que se sugiere que el efecto de Epi es modulado de manera diferente de acuerdo con cada tipo de microambiente en el que se encuentra.

A pesar de que se requiere de un mayor número de observaciones, es factible señalar que entre las 12 y 24 horas después del daño, existe un incremento en el tejido granular. Sin embargo, en el caso de los ratones que recibieron tratamiento, no hay un mayor incremento en el área con daño después de las 12h, como en el gastrocnemio; en el músculo TA, incluso disminuyó un 50% con respecto a grupo sin tratamiento, y a una tercera parte después de las 48 horas.

Por otro lado, la activación de proteínas miogénicas también es importante para el mantenimiento de la estructura muscular y para su reparación. En el TA observamos un incremento de MyoD en los grupos con daño y en el grupo sin daño con Epi después de las 12h con respecto al control. Un día después, a pesar de que el grupo con daño y sin tratamiento continúa elevado, de manera significativa se observa que en el grupo con daño y con tratamiento, incrementa considerable con respecto a los demás grupos.

Para el caso del gastrocnemio, únicamente en el grupo CD-E a las 0h hay diferencias significativas en el nivel de MyoD, posteriormente a las 12h incrementa de manera importante para los grupos con daño, y disminuye con el paso del tiempo; es decir, Epi no afecta la cantidad de MyoD que encontramos en este músculo en estos tiempos después del daño.

Aunque ya se había reportado que el tratamiento con Epi en ratones envejecidos incrementa MyoD y miogenina, así como la resistencia oxidativa y la angiogénesis (Gutierrez-Salmean, *et al.*, 2014), no se había reportado la respuesta diferencial que tiene MyoD en el tibial y en el gastrocnemio después del tratamiento.

En un modelo de células C2C12, y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés) aislados de la cepa de ratón C57BL/6, Epi promueve la activación de MyoD a través de proteínas involucradas en vías de miogénesis como lo son p38MAPK y Akt (Sang-Jin, *et al.*, 2017). Por lo que sería interesante llevar a cabo la evaluación de esta vía de señalización y comprobar si es la efectora para los cambios observados en el TA de los ratones tratados con Epi.

Por otra parte, miogenina es una proteína miogénica que lleva a cabo un papel relevante en el mantenimiento muscular (Kyba, 2016; Magli, 2017; Borisov, 2001). Esta proteína presenta un incremento importante de manera inmediata al daño químico tanto en el TA como en el gastrocnemio, aunque en este segundo se mantiene hasta las 24h. De manera interesante, se observa que hay una mayor cantidad de proteína en el músculo gastrocnemio que en el tibial anterior.

En el tibial, miogenina un día después del daño, tiene diferencias significativas en el grupo CD+E con respecto a los demás grupos; para el caso del gastrocnemio hay una mayor presencia de esta proteína durante todos los tiempos que se evaluaron en los grupos con daño, aunque de manera interesante, presenta diferencias significativas en el grupo sin daño con Epi con respecto a los ratones que no recibieron tratamiento a las 24h.

El comportamiento de cada uno de los factores miogénicos evaluados, podría deberse a que los músculos presentan una capacidad regenerativa y estrategias de reparación diferentes (Kyba, 2016); por ejemplo, Zimowska, y cols. (2008), demostraron que la respuesta regenerativa es diferente para los dos tipos de músculo, prevalentemente glucolítico u oxidativo. Estos investigadores mostraron que los mioblastos murinos producen MMP-2 y MMP-9 (las cuales son metaloproteasas, que reestructuran la matriz extracelular después del daño) de distinta

manera. Por una parte, durante la regeneración el nivel de la MMP-2 es más alto en el músculo oxidativo que en el glucolítico. La fusión de los mioblastos derivados del músculo glucolítico fue más lenta que en el oxidativo por 1 o 2 días, a pesar de que las células satélites de ambos músculos no presentaron diferencias en la expresión de las dos metaloproteasas *in vitro*.

De igual manera, Borisov, y cols. (2001) observaron que el músculo extensor largo de los dedos (EDL, músculo predominantemente glucolítico) y el músculo sóleo (músculo predominantemente oxidativo) manifiestan diferentes niveles de atrofia, estos autores mostraron que 2 meses después de la denervación, los niveles de atrofia del músculo EDL fue de 3 a 5 veces más grande que los niveles de atrofia que lo mostrado en el músculo sóleo. Por lo que estos autores proponen la existencia de dos tipos de respuesta miogénica, y que tienen diferentes patrones temporales: la primera respuesta es la miogénesis en la superficie de las fibras musculares intactas que mantiene la estructura del fenotipo diferenciado, y la segunda respuesta es una regeneración en la cual se reemplaza a la fibra muscular muerta. Estos procesos se presentan en repetidos ciclos de degeneración y regeneración; por lo que es de esperarse que en nuestro estudio tengamos picos de proteínas e incluso de núcleos centrales en diferentes momentos.

En el músculo TA, aunque los factores miogénicos evaluados se activaron después del daño, posteriormente no continuaron incrementando en el grupo CD-E, pero si en el grupo con CD+E, lo que sugiere que Epi podría modular algún mecanismo de regulación postraduccional para que sea permitida la acumulación de transcritos que generan la proteína, o bien incrementar la vida media de la proteína en el citoplasma, lo que permitiría una mayor acumulación de tal proteína.

Los niveles tanto de MyoD y de miogenina varían de acuerdo con el tipo de fibra y las proporciones en cada uno de los músculos esqueléticos (Hughes, 1993), por ejemplo, en rata la proteína de miogenina es 9 veces mayor en soleo, en comparación al músculo EDL (Zammit, 2017). La composición de las fibras afecta directamente la respuesta del músculo al daño, como lo reporta Guitart y cols. (2017), en el músculo gastrocnemio después de inducir el daño por inmovilización, muestra diferencias en el número de células satélites; no obstante, para el músculo soleo no hubo alteración en el número.

Dicho comportamiento es coincidente con este estudio, en el que el músculo gastrocnemio mostró una respuesta diferente de acuerdo al tipo de fibras. Las fibras tipo 2, a los 15 días después del daño presentaron un incremento en el área transversal. Armstrong y Esser (2005), identificaron que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina es activada durante la hipertrofia generada mecánicamente en el músculo plantaris del ratón, un músculo conformado principalmente por fibras tipo 2 (Bloemberg & Quadriatero, 2012); sin embargo, aunque se ha descrito que la activación de catenina durante la hipertrofia del músculo esquelético es predominante (Magli, 2017), en nuestro estudio no observamos cambios en los niveles de  $\beta$ -catenina para el músculo gastrocnemio con el tratamiento, por lo que se sugiere evaluar más tiempos, o bien la vía para la generación de hipertrofia no es a través de adición de mioblastos. Sin embargo, para corroborar esta propuesta es necesario realizar un mayor número de observaciones experimentales, en donde se analicen los niveles de  $\beta$ -catenina en tiempos mayores.

La respuesta de la proteína  $\beta$ -catenina (activa) es similar para ambos músculos dañados, activándose más rápido en el TA a las 0h, y a las 12h en el gastrocnemio. El tratamiento con Epi no muestra diferencias en el gastrocnemio, aunque en el caso de TA, incrementa en el grupo CD+E un día después, lo que concurre con lo observado para la proteína MyoD; lo cual

coincide con lo reportado en mioblastos de ratón adulto (Cui, *et al.*, 2019; Agle, *et al.*, 2017). La  $\beta$ -catenina es esencial para la diferenciación de las miofibras a través de MyoD, sin embargo, aunque en este estudio la hipertrofia en el grupo CD+E fue generada hasta los 15 días, no hubo una mayor cantidad de núcleos centrales en este tiempo, señal de adición celular; sólo se presentan diferencias significativas entre los grupos dañados en las primeras 12h después del daño. Lo anterior resulta de interés, debido a que, en el caso del músculo gastrocnemio, a pesar de que se observa un incremento de miogenina, no se manifiesta incremento en MyoD. Cabe mencionar que diferentes estudios señalan una situación similar a la anterior, por ejemplo, en el mismo músculo de ratas tratadas con Epi, reportaron incremento en dos importantes componentes de la vía de transporte de oxígeno (capilares y mitocondrias), sin cambios en la masa corporal o en la masa del músculo analizado, y solo en el perímetro del mismo (Hüttemann & Lee, 2012), aunque en este estudio, los autores no discuten las razones del por qué el perímetro cambia con el tratamiento de Epi y no el área, es interesante ya que el efecto de Epi varía con respecto al modelo animal que se usa para evaluarlo, y en nuestro caso, de acuerdo con el tipo muscular.

De manera semejante Sang-Jin y cols. (2017), observaron que Epi induce la hipertrofia de los miotubos a través de la activación de la vía Akt y p38MAPK en células de mioblasto de ratón C2C12., mientras que Hüttemann y cols. (2013), reportan observaciones similares en un trabajo realizado en el músculo plantaris de rata, en el cual después de 30 días de tratamiento incrementa la capilaridad y la biogénesis mitocondrial (medido a través del aumento de las proteínas PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y Tfam). De acuerdo a las características metabólicas similares que presenta el músculo plantaris con el TA y al observar que las fibras que crecieron en el músculo gastrocnemio fueron el tipo II, se puede plantear una correlación positiva entre el metabolismo

del músculo y la cantidad de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial y/o la síntesis de proteínas a través de la vía Akt y p38MAPK.

Por otro lado, como lo menciona McCarthy (2011), en un modelo de ratón condicionado (Pax7-DTA) en el cual después de la ablación de más del 90% de células satélites en el músculo maduro al administrar tamoxifen, mostró que luego de dos semanas, el músculo aún con la delección de las células satélites incrementa su masa y el área transversal (CSA) al igual que en el grupo control. Estos autores también muestran, que las fibras tampoco presentan diferencias en la fuerza específica, o en la sensibilidad al  $Ca^{2+}$ ; aunque los datos son debatibles debido al 10% de las células satélite que no fueron eliminadas. Este reporte, al igual que los resultados de la presente tesis, permiten sugerir que podrían no ser necesario el incremento en el número de células satélites para llevar a cabo la hipertrofia del músculo.

Cabe resaltar que, aunque MyoD y  $\beta$ -catenina estén incrementadas después de 24h después del daño en el TA, la hipertrofia no se observó sino hasta los 15 días después, lo que permite proponer que la activación transitoria de tales proteínas podría influir en la hipertrofia que se manifiesta días después. Sin embargo, sería importante estudiar en futuras investigaciones la participación de la vía de AKT/mTOR en el crecimiento muscular inducido por Epi, como lo reportado en el tejido cardíaco (De Los Santos, *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

El tratamiento con Epicatequina ejerce un efecto importante en la reparación del daño muscular desde las 24 horas después del daño, en el que se disminuye el área de daño de manera significativa para ambos músculos. En el músculo tibial anterior, las proteínas miogenina y  $\beta$ -catenina sólo son estimuladas con Epi cuando el músculo está dañado, aunque interesantemente para estimular a MyoD no fue necesario el daño, pues incrementa la proteína desde las 12h en el grupo SD+E.

La reparación del músculo dañado por BaCl<sub>2</sub> es más rápida en el músculo con prevalencia de fibras rápidas, TA. Para el caso del gastrocnemio, Epi sólo estimula la activación de miogenina un día después en el músculo sin daño (SD+E), coincidente con el incremento en el área transversal de las fibras tipo II en los ratones que recibieron tratamiento con Epi.

En este estudio, también, pudimos observar que el daño con cloruro de bario no promueve la generación de fibrosis, y por lo tanto no hay variación en los niveles de proteína miostatina. Adicionalmente, podemos concluir que la reparación muscular no solo depende de la activación de las proteínas miogénicas, si no también, depende de la susceptibilidad que presentan los músculos para ser dañados, y de los mecanismos de remodelación celular que son diferentes de acuerdo a las características de cada músculo, elementos que deben de tomarse en cuenta al evaluar el tratamiento de Epi sobre el músculo esquelético.

Estudios adicionales son requeridos para poder analizar de manera eficiente el efecto de Epi y cómo el microambiente modifica su actividad.

Además, es necesario evaluar si dicha hipertrofia es mantenida después de suspender el tratamiento y por cuanto tiempo, así como pruebas fisiológicas de los músculos analizados.

Finalmente, es necesario definir si la hipertrofia generada en el músculo gastrocnemio es llevada a cabo a través de la misma vía que el TA; así como dilucidar si las fibras tipo 2 son las únicas que con el tratamiento de Epi tienen la capacidad de crecer y que características definen la acción hipertrófica de Epi.

## REFERENCIAS

---

- Adhikaril, Abhinav., Kim, William., Daviel, Judith. (2021). Myogenin is required for assembly of the transcription machinery on muscle genes during skeletal muscle differentiation. PLoS ONE. 16(1): e0245618. <https://doi.org/10.1371/journal>.
- Agley, C. C; Lewis, F. C; Jaka, O; Lazarus, N. R; Velloso, C; Francis-West, P; Ellison-Hughes, G. M; Harridge, S. D. R. (2017). Active GSK3 $\beta$  and an intact  $\beta$ -catenin TCF complex are essential for the differentiation of human myogenic progenitor cells. Scientific Reports. 7:13189 doi:10.1038/s41598-017-10731-1
- Albuquerque, M. A. V; Abath-Neto, Osório; Maximino, J. R; Chadi, Gerson; Zanoteli, Edmar; Reed, U. C. (2014). Clinical aspects of patients with sarcoglycanopathies under steroids therapy. Arq. Neuropsiquiatr. 72(10):768-72. doi: 10.1590/0004-282x20140126.
- Angelini, C. (2015). Spectrum of metabolic myopathies. Biochimica et biophysica acta. 615–621
- Armstrong, D. D. & Esser, K. A. (2005). Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. Am J Physiol Cell Physiol. 289(4):C853-9. doi: 10.1152/ajpcell.00093.2005
- Arnold, Ludovic; Henry, Adeline; Poron, Françoise; Baba-Amer, Yasmine; Rooijen, N. van; Plonquet, Anne; Gherardi, R. K; Chazaud, Bénédicte. (2007). Infl ammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinfl ammatory macrophages to support myogenesis. JEM. 204(5):1057–1069
- Asfour, H. A., Allouh, M. Z., Said, R. S. (2018). Exp Biol Med (Maywood). 243(2):118-128. doi: 10.1177/1535370217749494

- Bittel, D. C; Chandra, G; Tirunagri, L. M. S; Deora, A. B; Medikayala, S; Scheffer, L; Defour, A; Jaiswal, J. K. (2020). Annexin A2 Mediates Dysferlin Accumulation and Muscle Cell Membrane Repair. *Cells*. 9(9):1919. doi: 10.3390/cells9091919.
- Bismuth, Keren; & Relaix, Frédéric. (2010). Genetic regulation of skeletal muscle development. *Exp Cell Res*. 316(18):3081-6. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.08.018
- Bloemberg, Darin; & Quadrilatero, Joe. (2012). Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. *PLoS ONE*. 7(4): e35273. doi:10.1371
- Bo Li, Z; Zhang, J; Wagner, K. R. (2012). Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *J Cell Sci*. 125(17):3957-65. doi: 10.1242/jcs.090365
- Borges, G; Ottaviani, J. I; Van der Hooft, J. J; Schroeter, H; Crozier, A. (2019). Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-Epicatechin: A review of recent findings. *Mol Aspects Med*. 61:18-30. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.002.
- Borisov, A. B., Dedkov, E. I., Carlson, B. M. (2001). Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec*. 203-18. doi: 10.1002/ar.1155.
- Brooks, S. V. (2003). Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Advances In Physiology Education*. 171-82
- Calve S; & Simon H. G. (2012). Biochemical and mechanical environment cooperatively regulate skeletal muscle regeneration. *FASEB J*. 25: 38-45.
- Carvajal, J.J; & Rigby, P. W. (2010). Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle. *Exp Cell Res*. 316(18):3014-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.005.

- Cassandrini, D., Trovato, R., Rubegni, A., Lenzi, S., Fiorillo, C., Baldacci, J., Minetti, C., Astrea, G., Bruno, C., Santorelli, F. M. (2017). Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Italian journal of pediatrics*. 101
- 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 Adh Migr*. 12(3):228-235. doi: 10.1080/19336918.2017.1346774
- Cheema, N., Herbst, A., McKenzie, D., Aiken, J. M. (2015). Apoptosis and necrosis mediate skeletal muscle fiber loss in age-induced mitochondrial enzymatic abnormalities. *Aging cell*. 1085–1093
- Choi, M. H; Ow, J. R; Yang, N. D; Taneja, R. (2015). Oxidative Stress-Mediated Skeletal Muscle Degeneration: Molecules, Mechanisms, and Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2016/6842568
- Collins, Charlotte; Olsen, Irwin; Zammit, Peter; Heslop, Louise; Petrie, Aviva; Partridge, Terence; Morgan, Jennifer. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 122:289-301
- Cui, Shuang; Li, Liang; Yu, Ruth T; Downes, Michael; Evans, Ronald M; Hulin, Julie-Ann; Makarenkova, Helen P; Meech, Robyn. (2019).  $\beta$ -catenin is essential for differentiation of primary myoblasts via cooperation with MyoD and  $\alpha$ -catenin. *Development*. 146: dev167080. doi: 10.1242/dev.167080
- 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(2). doi: 10.1002/mnfr.201600343

- 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(11):1188-1195. doi: 10.1016/j.numecd.2018.06.019
- Demonbreun, Alexis R; & McNally, Elizabeth M. (2017). Muscle cell communication in development and repair. *Current Opinion in Pharmacology.* 34:7–14
- D'Souza D. M., Al-Sajee D., Hawke T. J. (2013). Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front. Physiol.* doi:10.3389/fphys.2013.00379
- Ganassi, Massimo., Badodi, S., Wanders, K., Zammit, P. S., Hughes, S. M. (2020). Myogenin is an essential regulator of adult myofibre growth and muscle stem cell homeostasis. *Elife.* 9:e60445. doi: 10.7554/eLife.60445.
- Goh, Qingnian; & Millay, D. P. (2017). Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. *eLife.* 6: e20007. doi: 10.7554/eLife.20007
- Guardiola, O; Lafuste, P; Brunelli, S; Iaconis, S; Touvier, T; Mourikis, P; De Bock, K; Lonardo, E; Andolfi, G; Bouché, A; Liguori, G. L; Shen, M. M; Tajbakhsh, S; Cossu, G; Carmeliet, P; Minchiotti, G. (2012). Cripto regulates skeletal muscle regeneration and modulates satellite cell determination by antagonizing myostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(47):E3231-40. doi: 10.1073/pnas.1204017109
- Guitart, Maria; Lloreta, Josep; Mañas-Garcia, Laura; Barreiro, Esther. (2017). Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. *J Cell Physiol.* 233:4360–4372, doi: 10.1002/jcp.26282
- 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(1):91-4. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.007

Hardy, David; Besnard, Aurore; Latil, Mathilde; Jouvion, Grégory; Briand, David; Thépenier, Cédric; Pascal, Quentin; Guguin, Aurélie; Gayraud-Morel, Barbara; Cavaillon, Jean-Marc; Tajbakhsh, Shahragim; Rocheteau, Pierre; Chrétien, Fabrice. (2016). Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS ONE.* 11(1): e0147198 doi: 10.1371/journal.pone.0147198

Harris, J. B; & Cullen, M. J. (1990). Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc Rev.* 183-211

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. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.11.010

Houang, E. M; Haman, K. J; Filareto, Antonio; Perlingeiro, R. C; Bates, F. S; Lowe, D. A; Metzger, J. M. (2015). Membrane-stabilizing copolymers confer marked protection to dystrophic skeletal muscle in vivo. *Methods & Clinical Development.* 15042

Hughes, S. M., Taylor, J. M., Tapscott, S. J., Gurley, C. M., Carter, W. J., Peterson, C. A. (1993). Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development.* 118(4):1137-47. doi: 10.1242/dev.118.4.1137.

Hüttemann, M; Lee, I., Malek, M.H. (2012). (-)- Epicatechin maintains endurance training adaptation in mice after 14 days of detraining. *FASEB Journal.* 26(4):1413-22. doi: 10.1096/fj.11-196154

Incitti, T; Magli, A; Jenkins, A; Lin, K; Yamamoto, A; Perlingeiro, R. (2020). Pluripotent stem cell-derived skeletal muscle fibers preferentially express myosin heavy-chain isoforms

associated with slow and oxidative muscles. *Skeletal muscle*. 10(1):17. doi: 10.1186/s13395-020-00234-5.

Jung, H. W; Choi, J. H; Jo, T; Shin, H; Suh, J. M. (2019). Systemic and Local Phenotypes of Barium Chloride Induced Skeletal Muscle Injury in Mice. *Ann Geriatr Med Res*. 23(2):83-89. doi: 10.4235/agmr.19.0012.

Kopustinskiene, D. M; Savickas, A; Vetchý, D; Masteikova, R; Kasauskas, A; Bernatoniene, J. (2015). Direct effects of (-)-Epicatechin and procyanidin B2 on the respiration of rat heart mitochondria. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/232836

Kyba, Michael. (2016). *Skeletal Muscle Regeneration in the Mouse*. Springer Nature. Minneapolis, MN, USA

Lee, S. J. (2004). Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:61-86, doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836

Lee, Se-Jin., Lee, Yun-Sil., Zimmers, Teresa A., Soleimani, Arshia., Matzuk, Martin M., Tsuchida, Kunihiro., Cohn, Ronald D., Barton, Elisabeth R. (2010). Regulation of Muscle Mass by Follistatin and Activins. *Mol Endocrinol*. 24(10):1998–2008

Lee, Icksoo; Hüttemann, Maik; Kruger, Adele; Bolling-Fischer, Aliccia; Malek, Moh. (2015). (-)-Epicatechin combined with 8 weeks of treadmill exercise is associated with increased angiogenic and mitochondrial signaling in mice. *FrontiersinPharmacology*. 6:43 doi: 10.3389/fphar.2015.00043

Liu, Ling; Cheung, Tom. H; Charville, G. W; Ceniza, H. B. M; Leavitt, Tripp; Shih, Johnathan; Brunet, A; Rando, T. A. (2013). Chromatin Modifications as Determinants of Muscle Stem Cell Quiescence and Chronological Aging. 189–204. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.043

- Liu, Xiaoguang; Zhen, Lifang; Zhou, Yongzhan; Chen, Yingjie; Chen, Peijie; Xiao, Weihua. (2019). BMSC Transplantation Aggravates Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis and Impairs Skeletal Muscle Regeneration. *Front Physiol.* 13; 10:87. doi: 10.3389/fphys.2019.00087. eCollection.
- Magli, Alessandro; & Perlingeiro, R. (2017). Myogenic Progenitor Specification from Pluripotent Stem Cells. *Semin Cell Dev Biol.* 87–98
- McCarthy, J; Mula, J; Miyazaki, M; Erfani, R; Garrison, K; Farooqui, A.B; Srikuea, R; Lawson, B.A; Grimes, B; Keller, C; Zant, G; Campbell, K; Esser, K; Dupont-Versteegden, E; Peterson, C. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. 3657-3666, doi:10.1242/dev.068858
- McDonald, C. M; Ramirez-Sanchez, I; Oskarsson, B; Joyce, N; Aguilar, C; Nicorici, A; Dayan, J; Goude, E; Abresch, R. T; Villarreal, F; Ceballos, G; Perkins, G; Dugar, S; Schreiner, G; Henricson, E.K. (2021). (-)-Epicatechin induces mitochondrial biogenesis and markers of muscle regeneration in adults with Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 239-249.
- McGrath, E. R., Doughty, C. T., Amato, A. A. (2018). Autoimmune Myopathies: Updates on Evaluation and Treatment. *Neurotherapeutics.* 15(4):976-994. doi: 10.1007/s13311-018-00676-2.
- Moreno-Ulloa, A; Cid, A; Rubio-Gayosso, I; Ceballos, G; Villarreal, F; Ramirez-Sanchez, I. (2013). Effects of (-)-Epicatechin and derivatives on nitric oxide mediated induction of mitochondrial proteins. *Bioorg Med Chem Lett.* 23(15):4441-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.05.079.
- Moreno-Ulloa, A; Nájera-García, N; Hernández, M; Ramírez-Sánchez, I; Taub, P. R; Su, Y; Beltrán-Partida, E; Ceballos, G; Dugar, S; Schreiner, G; Best, B. M; Ciaraldi, T. P; Henry, R. R; Villarreal, F. (2018). A pilot study on clinical pharmacokinetics and preclinical

pharmacodynamics of (+)-Epicatechin on cardiometabolic endpoints. *Food Funct.* 9(1):307-319. doi: 10.1039/c7fo01028a.

Morton, A. B; Norton, C. E; Jacobsen, N. L; Fernando, C. A; Cornelison, D. D. W; Segal, S. S. (2019). Barium chloride injures myofibers through calcium-induced proteolysis with fragmentation of motor nerves and microvessels. *Skeletal Muscle.* 9:27 doi:10.1186/s13395-019-0213-2

Motohashi, N; & Asakura, A. (2014). Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *StemCell.* 2:1, doi: 10.3389/fcell.2014.00001.

Murphy, M. M; Lawson, J. A; Mathew, S. J; Hutcheson, D. A; Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development.* 138(17):3625-37. doi: 10.1242/dev.064162.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Recuperado el 01 de 09 de 2021. Myopathy. de <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Myopathy-Information-Page>

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.* 589.18 (4625-4631)

Ottaviani, J. I; Momma, T. Y; Heiss, C; Kwik-Urbe, C; Schroeter, H; Keen, C. L. (2011). The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radic Biol Med.* 50(2):237–44. PubMed: 21074608

Ottaviani, Javier I; Borges, Gina; Momma, Tony Y; Spencer, Jeremy P. E; Keen, Carl L; Crozier, Alan; Schroeter, Hagen. (2016). The metabolome of [2-14C] (-)-Epicatechin in humans:

implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Scientific Reports*. 6:29034, doi: 10.1038/srep29034

Pasnoor, M., Barohn, R. J., Dimachkie, M. M. (2014). Toxic myopathies. *Neurologic clinics*. 647–viii.

Patel, Ketan. (1998). Molecules in Focus Follistatin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1087-1093

Pette, Dirk; & Staron, R. S. (2000). Myosin Isoforms, Muscle Fiber Types, and Transitions. *Microsc Res Tech*. 50:500–509; doi: 10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7

Preußeb, Corinna; Moersb, Arpad von; Kölbelc, Heike; Pehl, Debora; Goebelad, Hans-Hilmar; Schara, Ulrike; Stenzel, Werner. (2019). Inflammation-induced fibrosis in skeletal muscle of female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *ELSEVIER*. 21:34 doi: 10.1016/j.nmd.2019.05.003

Quiñones, M; Miguel, M; Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*. 7:76-89, doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418

Ramirez-Sanchez, Israel; Taub, P. R; Ciaraldi, Theodore P; Nogueira, Leonardo; Coe, Taylor; Perkins, Guy; Hogan, Michael; Maisel, Alan S; Henry, Robert R; Ceballos, Guillermo; Villarreal, Francisco. (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(4): 3982–3990. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.089.

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 delta sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J.* 281(24): 5567-5580

Randolph, M. E; & Pavlath, G. K. (2015). A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups. *Front. Aging Neurosci.* 7:190, doi:10.3389/fnagi.2015.00190

Rinaldi, Fabrizio; Zhang, Yu; Mondragon-Gonzalez, Ricardo; Harvey, Jeffrey; Perlingeiro, Rita C. R. (2016). Treatment with rGDF11 does not improve the dystrophic muscle pathology of mdx mice. *Skeletal Muscle.* doi:10.1186/s13395-016-0092-8

Rinaldo, D; Batista, J. M; Rodrigues, J; Benfatti, A. C; Rodrigues, C. M; dos Santos, L. C; Furlan, M; Vilegas, W. (2010). Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. *Chirality.* 22(8):726-33. doi: 10.1002/chir.20824.

Sambasivan, R; Comai, G; Le, Roux. I; Gomès, D; Konge, J; Dumas, G; Cimper, C; Tajbakhsh, S. (2013). Embryonic founders of adult muscle stem cells are primed by the determination gene *Mrf4*. *Dev Biol.* 381(1):241-55. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.04.018.

Sang-Jin, Lee; Young-Eun, Leem; Ga-Yeon, Go; Younhee, Choi; Yoo, Jin. Song; Insol, Kim; Do, Yoon. Kim; Yong, Kee. Kim; Dong-Wan, Seo; Jong-Sun, Kang; Gyu-Un, Bae. (2017). Epicatechin elicits MyoD-dependent myoblast differentiation and myogenic conversion of fibroblasts. *PLoS One.* 12(4): e0175271. doi: 10.1371/journal.pone.0175271

Schiaffino, Stefano; & Reggiani, Carlo. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 447–1531

Sharma, M., McFarlane, C., Kambadur, R., Kukreti, H., Bonala, S., Srinivasan, S. (2015). Myostatin: expanding horizons. *IUBMB Life.* 67(8):589-600. doi: 10.1002/iub.1392.

- Shay, Joseph; Elbaz, H. A; Lee, Icksoo; Zielske, S. P. (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015:181260. doi: 10.1155/2015/181260
- Simon, L; Jolley, S. E; Molina, P. E. (2017). Alcoholic Myopathy: Pathophysiologic Mechanisms and Clinical Implications. *Alcohol Res*. 38(2):207-217. PMID: 28988574
- Smith, H. K; Matthews, K.G; Oldham, J. M; Jeanplong, F; Falconer, S. J; Bass, J. J; Senna-Salerno, M; Bracegirdle, J. W; McMahon, C. D. (2014). Translational signalling, atrogenic and myogenic gene expression during unloading and reloading of skeletal muscle in myostatin-deficient mice. *PLoS One*. 9(4):e94356. doi: 10.1371/journal.pone.0094356. eCollection 2014.
- Stearns-Reider, K. M; D'Amore, A; Beezhold, K; Rothrauff, B; Cavalli, L; Wagner, W. R; Vorp, D. A; Tsamis, A; Shinde, S; Zhang, C; Barchowsky, A; Rando, T. A; Tuan, R. S; Ambrosio, F. (2017). Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion. *Aging Cell*. 16(3):518-528. doi: 10.1111/acer.12578.
- Taub, P. R; Ramirez-Sanchez, I; Ciarald, T. P; Gonzalez-Basurto, S; Coral-Vazquez, R; Perkins, G; Hogan, M; Maisel, A. S; Henry, R. R; Ceballos, F; Villarreal, F. (2013). Perturbations in skeletal muscle sarcomere structure in patients with heart failure and type 2 diabetes: Restorative effects of (-)-Epicatechinrich cocoa. *Clinical Science*.125(8):383-389. doi:10.1042/CS20130023
- Torres, G; De Souza, S; Zanette, R; Soares, Do. A. D; Da Guia, F. C; Pereira, M. C; Maurmann, C; Da Silveira, G. G. E; Paes, R. J; Chaves, R. N; Resende, A. M; De Sá, S. F; Da Costa, M. C. M. (2015). Satellite Cells: Regenerative Mechanisms and Applicability in Muscular Dystrophy. *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2015/487467

- Urciuolo, A; Quarta, M; Morbidoni, V; Gattazzo, F; Molon, S; Grumati, P; Montemurro, F; Tedesco, F. S; Blaauw, B; Cossu, G; Vozzi, G; Rando, T. A; Bonaldo, P. (2013). Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun.* 4:1964. doi: 10.1038/ncomms2964.
- Wallace, G. Q; & McNally, E. M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annual review of physiology.* 37-57
- Yamazaki, K. G; Andreyev, A. Y; Ortiz-Vilchis, P; Petrosyan, S; Divakaruni, A. S; Wiley, S. E; De La Fuente, C; Perkins, G; Ceballos, G; Villarreal, F; Murphy, A. N. (2014). Intravenous (-)-Epicatechin reduces myocardial ischemic injury by protecting mitochondrial function. *Int J Cardiol.* 175(2):297-306. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.05.009
- Yuan, S; Li, X; Jin, Y; Lu, J. (2017). Chocolate Consumption and Risk of Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrients.* 9(7):688. doi: 10.3390/nu9070688.
- Zammit, P. S. (2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 72:19-32. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.11.011.
- Zimowska, M., Brzoska, E., Swierczynska, M., Streminska, W., Moraczewski, J. (2008). Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int. J. Dev. Biol.* 52(2-3):307-14. doi: 10.1387/ijdb.072331mz.



## RESEARCH PAPER

(-) - Epicatechin improves *Tibialis anterior* muscle repair in CD1 mice with BaCl<sub>2</sub>-induced damage

Magally Ramírez-Ramírez<sup>a,b</sup>, Francisca Fernández-Valverde<sup>c</sup>, Andrea Reséndiz-García<sup>b,f</sup>,  
Mirna G Martínez-Damas<sup>a,b</sup>, Luis Javier Cano-Martínez<sup>f</sup>, Alejandro Zentella-Dehesa<sup>d,e</sup>,  
Ramón M Coral-Vázquez<sup>b,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, USA

<sup>b</sup> 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, USA

<sup>c</sup> Laboratorio de Patología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Mexico City, Mexico, USA

<sup>d</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, USA

<sup>e</sup> Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico, USA

<sup>f</sup> Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico, USA

Received 27 May 2021; received in revised form 5 February 2022; accepted 26 April 2022

## Abstract

Several studies have shown the beneficial effect that Epicatechin (Epi) has on the skeletal muscle of murine models and patients with muscular dystrophy and in the muscles of patients with diabetes or murine sarcopenia models. This flavanol has been shown to enhance antioxidant pathways and improve muscle architecture. However, the repair process during muscle regeneration has not been analyzed. To address this, we characterize the effect of Epi in the repair process of the *Tibialis anterior* in a murine model with BaCl<sub>2</sub>-induced damage. CD1 mice of 10 weeks of age were randomly selected and injured with BaCl<sub>2</sub>. One hour later, they were divided into four groups ( $n=6$  for histology groups and  $n=12$  for western blot groups). Epi was administered every 12h, until the time of sacrifice. Histological and morphological analysis showed that Epi significantly reduced the area of damage and hypertrophy at 15 days in the damaged muscle. Furthermore, western blot assays showed that the treatment increases  $\beta$ -catenin (active) and myogenic proteins such as MyoD and Myogenin. These results show that Epi exerts therapeutic effects accelerating skeletal muscle repair after induced damage chemically, thus highlighting the therapeutic potential of this flavanol in different myopathies.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** (-) Epicatechin; muscular repair; skeletal muscle; chemical damage; BaCl<sub>2</sub>.

## 1. Introduction

Skeletal muscle (SkM), the tissue that represents approximately 40% of the body weight, has a remarkable regenerative capacity [1,2]. After damage by injury or by degenerative diseases such as muscular dystrophy [3], two critical phases have been identified: the phase of degeneration of the sarcolemma or necrosis of the fiber due to an inflammatory process; and the regeneration phase through the activation of satellite cells, and subsequent differentiation and fusion to the damaged fibers [4].

The mechanism by which the satellite cells differentiate to myoblasts and bind to damaged muscle fibers has not been entirely

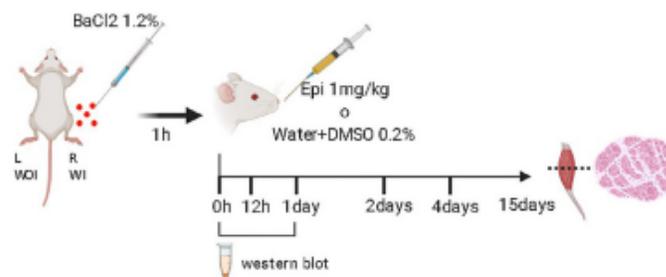
described. However, recently it has been observed that  $\beta$ -Catenin, in coordination with MyoD, is essential for the differentiation of primary myoblasts [5].

On the other hand, the muscle repair capacity could be affected by the biochemical and mechanical environment of the tissue [6]. In addition, genetic diseases, such as muscular dystrophies [7], or other pathological conditions that affect it indirectly, such as diabetes mellitus [8], can influence the muscular environment. Other characteristics that could affect muscle regeneration are aging [9,10], the presence of inflammation [11], the number of satellite cells available for repair, and their activation capacity, among others [12].

Different therapies have been developed to improve muscle repair capacity, such as the use of anti-inflammatory drugs [13], immunological treatments that target profibrotic proteins [14], and stem cell transplantation [15,16]. However, none of these treatments have shown good efficacy, and others are invasive and ex-

\* Corresponding author: Ramón M. Coral-Vázquez, Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, Ciudad de México, México.

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



**Fig. 1.** Strategy to evaluate the effect of Epi on BaCl<sub>2</sub>-induced chemical muscle injury. 10-week-old male mice of the CD1 strain were injured in the right hind leg with BaCl<sub>2</sub> (WI-E), and the vehicle was injected into the left hind leg (WOI-E). One hour after injury, a group of animals was sacrificed; this time corresponded to groups 0 h. The remaining animals were divided into two groups; one group was treated every 12 h with Epi and the control group with vehicle (water + 0.2% DMSO). Subsequently, groups of animals were sacrificed at 12 and 24 hours, 2 days, 4 days and 15 days, and the tibialis was dissected to perform the different tests.

pensive [15, 17–19]. In such a way that it is necessary to look for alternatives that can complement existing therapies.

In that context, the flavanol (–)-Epicatechin (Epi), a component present in high concentrations in cocoa, has shown to have multiple benefits in human health [20,21]. In SkM, Epi has positive effects in mitochondrial biogenesis and muscle regeneration associated with improving exercise parameters in patients with Becker muscular dystrophy [22]. Our group has reported that Epi treatment reduces fibrosis and improves skeletal muscle function related to its ability to impact molecular regulatory mechanisms in  $\delta$ -sarcoglycan knockout mice, a model for muscular dystrophy [23]. In addition, Epi-rich cocoa improves the sarcomeric microstructure of skeletal muscle in patients with type 2 diabetes [24].

The present study aimed to examine the effects of Epi treatment on the skeletal muscle repair process, including histological parameters and proteins involved in myogenesis in CD1 mice with BaCl<sub>2</sub>-induced damage.

## 2. Methods

### 2.1. Animal model

One hundred twenty-six 10-week-old male CD-1 mice were used for all experiments. Performance of all procedures was following the ethics code of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources (<http://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>), approved in Mexico by the National Academy of Medicine and following the Mexican Official Standard Norm NOM-062-ZOO-1999.

### 2.2. BaCl<sub>2</sub> muscle injury model

Initially, mice were anesthetized with 80 mg/kg body weight of ketamine (PISA) and 5mg/kg body weight of xylazine (PISA) injected ip. Then, the chemical injury was carried out using 1M injection of 50  $\mu$ l of BaCl<sub>2</sub> (1.2% in sterile demineralized water) (Sigma Aldrich, MO, USA) in five points (10 $\mu$ l each one) of the right leg using an insulin syringe [25]. The left legs were used as the control muscle without injury.

### 2.3. Experimental design and approach

After the injury with BaCl<sub>2</sub>, the 132 mice were allocated into two groups: one group without Epi-treatment, only with the vehicle, with the right leg injured with BaCl<sub>2</sub> (WI-E), and left leg without damage (WOI-E); and another group Epi-treatment with a right leg injured with BaCl<sub>2</sub> (WI+E) and left leg without injury (WOI+E). All animals were housed on a fixed 12-h light/dark cycle and fed with a normal chow diet. One hour after the injured mice were treated, by oral gavage twice daily (morning and evening), with either vehicle (water+ DMSO 0.2%) or 1 mg/kg body mass of Epi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), until the moment of sacrifice. Post-treatment, mice were sacrificed at different times by cervical dislocation afterward 80 mg/kg body weight (BW) of ketamine (ketamine hydrochloride 200 mg/mL) and 10 mg/kg BW of xylazine (xylazine hydrochloride 20mg/mL) injected ip (Fig. 1). The tibialis anterior (TA) muscles were collected for histological and molecular analyses. The TA of both hind legs were obtained at different times

to evaluate the effect of Epi-treatment in muscle repair: 1 h after the injury (0h time), 12 h, and one day after the injury; and to evaluate the effect of Epi-treatment in the fiber size and central nuclei, the muscles were collected at 2, 4 and 15 days after the injury.

### 2.4. Histological analysis

In order to evaluate histological alterations, half of the right and left TA muscles were snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Serial muscle cross-sections (7  $\mu$ m-thick) were stained with hematoxylin-eosin (HE).

### 2.5. Morphometric analysis

The complete TA muscle-stained sections were examined by AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 software. The cross-sectional area of at least 200 randomly selected fibers was obtained, and the central nuclei of all fibers were counted with the Cell counter from Fiji Image J software. The size of the damage was considered as the total area with granular tissue in the cross-section.

### 2.6. Western blotting

Approximately 50mg of skeletal muscle tissues were homogenized in NP-40 lysis buffer (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1% Igepal) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Thermo Fisher # A32959). Total protein content was measured in the supernatant with the Bradford method. Then, 50  $\mu$ g of protein was loaded onto a 10% denaturing SDS-PAGE gel and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (0.25  $\mu$ m<sup>2</sup>, Pierce, P01-88018). Membranes were incubated for 1 h in blocking solution [5% powdered skim milk TBS plus 0.05% Tween 20 (TBS-T)] followed by incubation for 14 h at 4°C with appropriate primary antibody used according to the recommendations of the manufacturer: GAPDH (1:4000 Thermo Fisher # MA5-15738),  $\beta$ -Catenin (1:800 Cell Signaling #88145), myostatin (1:500 Thermo Fisher # PA5-11936), MyoD (1:500 Thermo Fisher # MA5-12902), myogenin (1:200 Thermo Fisher # F5D). Then, membranes were washed (3 $\times$ 5 min) with PBS-T 0.1% and incubation HRP-secondary antibody: 1:10000 Anti Mouse (Jackson #715-035-150) or 1:10000 Anti-rabbit (Cell Signaling #7074s). Detection of interest proteins was done with SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate kit (34095, Thermo Scientific). Band intensities were digitally quantified using LI-COR Image Studio™ software ([http://www.licor.com/bio/products/software/image\\_studio\\_lite/](http://www.licor.com/bio/products/software/image_studio_lite/)).

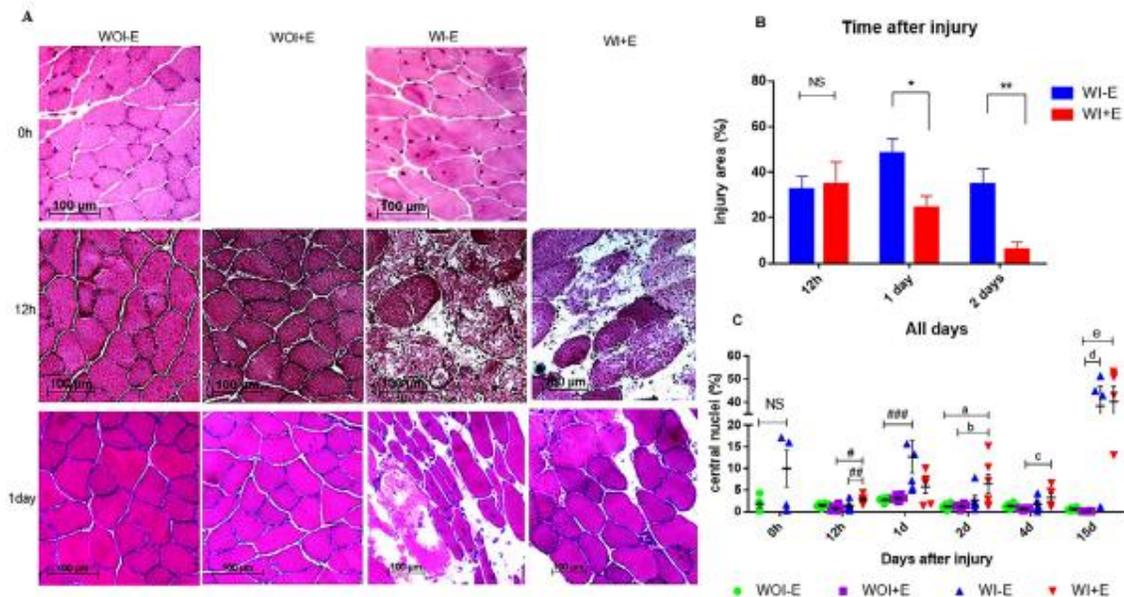
### 2.7. Statistical analyses

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and analyzed with the GraphPad Prism6. Data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test, Mann-Whitney U, and one or two way-ANOVA tests. When appropriate, post hoc Tukey's analysis was used to determine which means were significantly different from each other. Statistical significance was defined when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Epi accelerate repair in injured muscles

Since one of the main approaches was to evaluate Epi's impact on the muscle regeneration process after BaCl<sub>2</sub> injury, we decided



**Fig. 2.** Histological analysis of Epi treated and untreated mice muscles. A. H&E staining showed loss of muscle structure and granular tissue infiltration at 12 and 24 hrs after injury with BaCl<sub>2</sub>. B. Mice with lesion and Epi (WI+E) showed a smaller lesion area after 24 h (\*  $p < .05$ ), and the reduction was more evident two days after damage (\*\*  $p = .0149$ ). C. The central nuclei are shown in percentage concerning the total of fibers. At 12h there are significant differences when comparing WOI+E vs. WI+E (\*  $p = .0025$ ), and WI-E vs. e WI+E (\*\*  $p = .032$ ). At 24 h, only significant differences were observed when comparing WI-E vs. WOI-E (\*\*\*)  $p = .0174$ ); at 2 days, we observed differences between WOI-E vs. WI+E (<sup>†</sup> $p = .0372$ ) and WOI+E vs. WI+E (<sup>‡</sup> $p = 0.0402$ ); at 4 days between WOI-E vs. WI+E (<sup>†</sup> $p = .0076$ ) and finally at 15 days between WOI+E vs. WI-E (<sup>†</sup> $p = .0037$ ) and WOI+E vs. WI+E (<sup>†</sup> $p = .0017$ ). All data are expressed as mean $\pm$ SEM and analyzed with two-way ANOVA and Sidaks multiple comparisons test  $n=6$  per group.

to study the *tibialis anterior* (TA) muscle, which has a prevalence of type 2 fibers of 99% [26]. Consequently, by H&E, we evaluated the TA muscle at 0h, 12 hr, 1, 2, 4, and 15 days after the injury (Fig. 2, Panel A and B). At 12 h post-BaCl<sub>2</sub> injury, no significant difference in the injured muscle area was observed between Epi-treated (WI+E) and non-treated mice (WI-E). However, one day after BaCl<sub>2</sub> damage, there was a significant reduction in the lesion area of the skeletal muscle of Epi-treated mice (WI+E) when compared to the damaged muscles of non-flavanol-treated mice (WI-E) ( $24.15 \pm 5.5$  and  $48.32 \pm 6.437$ , respectively;  $P < .05$ ). The decrease in the area of damage was even more evident on day two after BaCl<sub>2</sub> injection in the Epi-treated mice than those not treated with Epi. (WI+Epi  $6.128 \pm 3.057$  vs. WI-Epi  $34.62 \pm 6.995$ ;  $P = .0149$ ). Subsequently, at four days post-injury, a large amount of infiltrating granular tissue was present in the injured muscle of non-Epi-treated mice (WI-E). In contrast, the granular infiltrate was greatly reduced in the muscle of Epi-treated animals (Fig. 4, Panel A). Besides, Epi treatment did not show any evident effect in the muscle of the non-injured muscles (WOI+E) when compared to the non-injured muscles of mice without Epi treatment (WOI-E) (Figs. 3 and 4, panel A).

Also, we carried out an analysis of central nuclei (Fig. 2, Panel C), a signal of muscle regeneration [4]. As expected, there were few central nuclei in the non-injured muscle of the mice treated (WOI+E) and non-treated with Epi (WOI-E) in all the analyzed times. However, after one hour of BaCl<sub>2</sub> damage (time 0, previous to the Epi treatment), the fiber muscles (WI-E) increased the number of central nuclei. Then, at 12 hrs, the number of central nuclei was significantly increased in damaged fibers from Epi-treated mice (WI+E) compared to damaged muscles from non-Epi-treated animals (WI-E) ( $2.8 \pm 0.388$  and  $1.332 \pm 0.444$ , respectively,  $P = .032$ ). However, although there was an increase in the number of

central nuclei at the other post-injury times, there were no significant differences between these two groups.

### 3.2. Epi generates hypertrophy in injured muscles

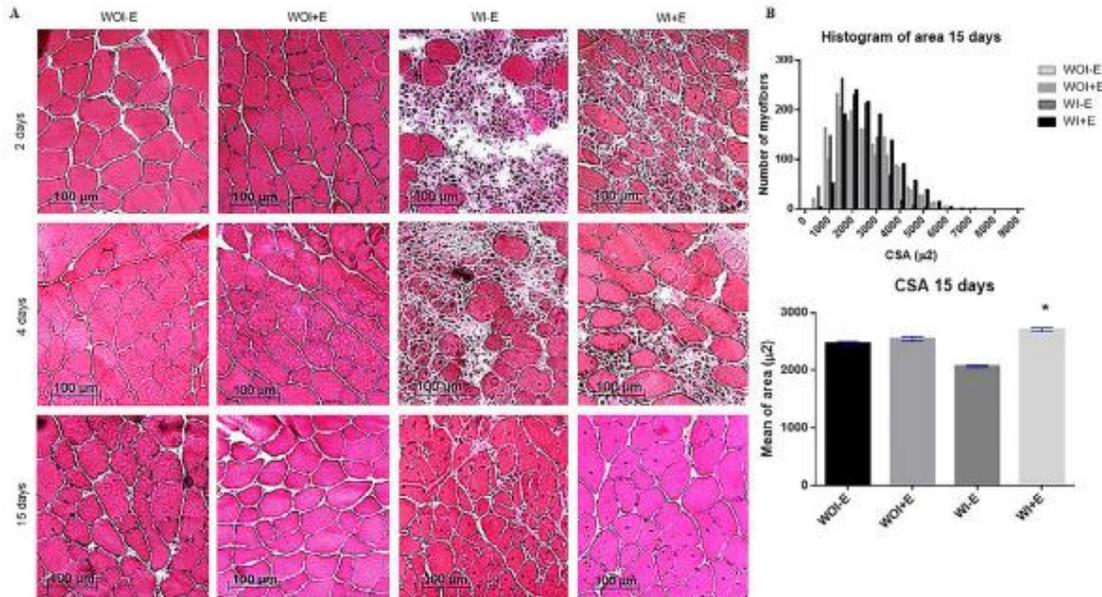
Previous observations by our group have shown that Epi treatment-induced hypertrophy in normal cardiac fibers [27], so we consider evaluating this parameter in skeletal muscle. We assessed the muscle fibers' cross-sectional area (CSA) at 2, 4, and 15 days (Fig. 3, Panel A and B). No differences were observed in CSA at 2 and 4 days, but at 15 days, the Epi treatment increased the area ( $P = .0243$ ) in the injured muscles (WI+E) versus the WI-E group ( $2699.042 \pm 57.65815$  and  $2111.425 \pm 187.3555$ , respectively).

### 3.3. Epi increase level of myogenic proteins

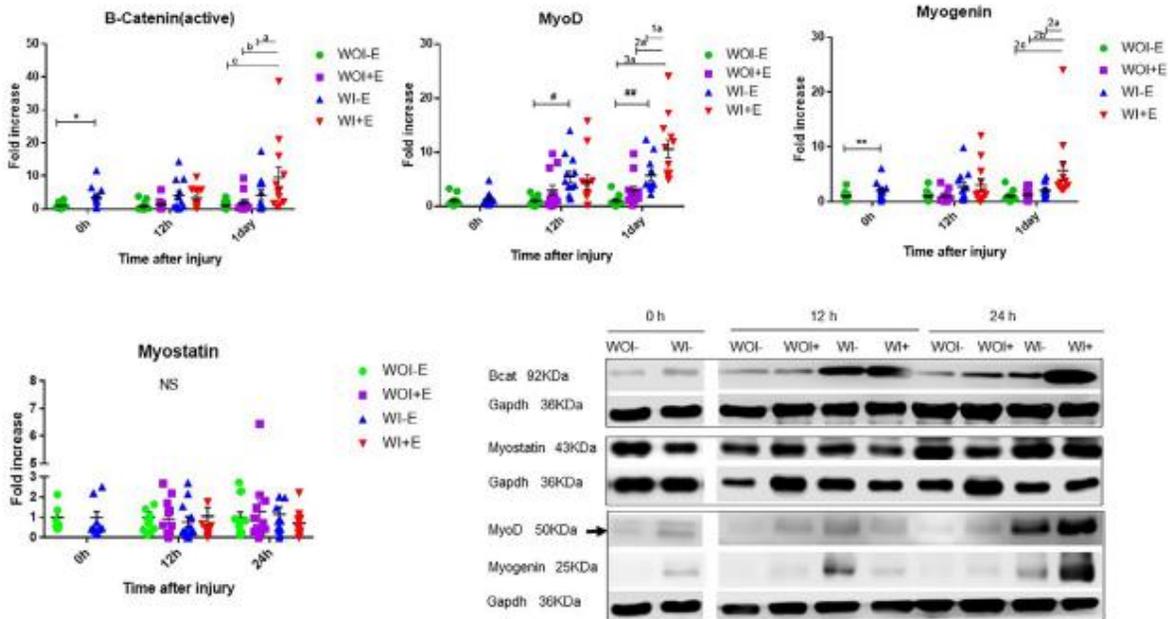
The repair process was faster than we expected. Therefore, we evaluated previous times with different markers of muscle growth like myostatin and myogenesis like MyoD, Myogenin. We did not observe any significant difference in myostatin protein at 0h, 12h, and one day after injury between the groups. After the injury, the increase in the  $\beta$ -Catenin protein (active) was observed, but at 12 h, there was no difference. Then one day post injures, differences were observed in WI+E group concerning the rest of the groups. MyoD expression increased up to 1 day after injury in the same group. Interestingly, Myogenin shows significant differences from 0 h after injury in the treated group even when the MyoD protein is not present, showing behavior similar to  $\beta$ -Catenin (Fig. 4).

## 4. Discussion

Here we studied the effect of Epi in acquired skeletal muscle damaged using as a model the BaCl<sub>2</sub> induced injury [25]. The study



**Fig. 3.** Epi induces hypertrophy at 15 days in the injured muscle. A. The H: E staining showed a faster recovery process in the WI+E group mice than the WI-E group. B. The muscle fibers of the WI+E group mice have at 15 days a significant increase in size compared with WI-E group (\* $p = .0243$ ). All data are expressed as histogram and scatter plot (C), the mean $\pm$ SEM, the data were analyzed by means, 2-way ANOVA, and Tukey HSD post hoc for comparison between groups.  $n=6$  per group.



**Fig. 4.** Expression of  $\beta$ -catenin, MyoD and Myogenin. Western blot analysis showed changes in myostatin levels at different times, with a drastic reduction at 24 hrs; however, there were no significant differences between the different groups,  $n=6$  per group. Treatment with Epi significantly increased the level of  $\beta$ -catenin in the WI+E group on day 1 vs WI-E (<sup>a</sup> $p < .05$ ), vs WOI+E (<sup>b</sup> $p = .002$ ) and vs WOI-E (<sup>c</sup> $p = .0006$ ). Concerning MyoD, a significant increase was observed at 12 h in the WI-E vs. WOI-E group and (<sup>#</sup> $p = .015$ ). At 24 h, the WI+E group showed a higher level when compared with the other groups (WI-E, <sup>a</sup> $p = .0077$ ; WOI+E, <sup>b</sup> $p = .0001$ ; and, WOI-E, <sup>c</sup> $p = .0001$ ). An increase in the protein was also determined in the WI-E vs. WOI-W group (<sup>\*\*</sup> $p = .0095$ ). The increase in the myogenin level was observed from time 0 h in the group with damage (<sup>\*\*</sup> $p = .044$ ). Subsequently, this protein showed, on day 1, a significant increase in the WI+E group when compared with the other groups (WI-E, <sup>a</sup> $p = .0142$ ; WOI+E, <sup>b</sup> $p = .0019$ ; and WOI-E, <sup>c</sup> $p = .001$ ). All data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Mann Whitney for groups 0h, and bidirectional ANOVA and Tukey HSD post hoc tests for comparison between groups and times.  $n=12$  per group.

results indicated that flavanol significantly impacts repairing chemically damaged muscle from one day after damage.

BaCl<sub>2</sub> induces extensive histopathological changes in muscle after injection, with marked and extensive necrosis at 18h [28]. However, the repair promoted by Epi was faster than expected, so it was decided to evaluate shorter times 0h, 12h, and one day. Interestingly, the mice treated with Epi showed a significant reduction in the necrosis area at 24 hrs, which was more evident two days after treatment. Hardy et al. [28] have reported that total recovery of muscle histology occurs one month after chemical damage. Interestingly, in the animals treated with Epi, the improvement in histology at two days was noticeable even when we observed an increase in central nuclei at 15 days on injury groups. There was also a statistically significant enlargement of the muscle fiber area in the BaCl<sub>2</sub>-damaged muscles of Epi-treated mice compared with the other groups, being the difference more drastic when compared with the WI-E group. The enlargement of the fibers and the increase of the central nuclei induced by the treatment with Epi suggests that flavanol could have the capacity to generate muscle growth due to changes in cell turnover [29]. Muscle growth may also be associated with protein turnover [30], which is necessary to investigate in future studies. On the other hand, it has been proposed that epi has exercise-like effects on the body [31], particularly skeletal muscle. In this regard, Bruusgaard and colleagues [32] have suggested that the increased number of nuclei during exercise overload is a significant cause of skeletal muscle hypertrophy. Consequently, the increase of central nuclei associated with the muscle enlargement in our study may be a consequence of the myonuclei accretion, a phenomenon observed in skeletal muscle exercise-induced remodeling [33].

The beneficial effects of Epi are also exerted in the skeletal muscle of a  $\delta$ -sarcoglycan knockout mouse, a genetic model for limb-girdle muscular dystrophy [23].

It has been shown that the BaCl<sub>2</sub> skeletal muscle injures does not induce fibrosis [28]; besides, myostatin is a direct regulator of fibrosis in the skeletal muscle [34]. In concordance with this, we did not observe significant differences in the protein level when compare all the groups at any time.

Bernardi et al. [35] have shown that the canonical  $\beta$ -Catenin pathway regulates myostatin negatively. Seven days post injures with BaCl<sub>2</sub>, the protein expression level of  $\beta$ -Catenin increases in the *Tibialis* muscle [36]. In addition, it has been observed that the increase in the expression of genes of the Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway participates in the muscle repair process after contusion damage [37]. In addition, the canonical WNT/ $\beta$ -Catenin signaling pathway participates in muscle development and regeneration [38–40]. The present study showed a significant increase in the  $\beta$ -Catenin active protein level an hour after the injure (time 0h) with BaCl<sub>2</sub>. Interestingly, in muscles damaged with BaCl<sub>2</sub>, Epi treatment induced a significant increase in the  $\beta$ -Catenin level at 24 hrs; this may suggest that the flavanol accelerates the muscle repair through the  $\beta$ -Catenin pathway. Besides,  $\beta$ -Catenin has been proposed to play a role in muscular hypertrophy by targeting myogenic factors [41,42] and participates in the differentiation of primary myoblasts via cooperation with MyoD [5]. In this regard, the Epi treatment induced a statistically significant increment of MyoD at 24 hrs in the injured skeletal muscle compared with the other groups. Myogenin, another myogenic transcription factor that participates in skeletal muscle regeneration [43], also increased its expression 24 hrs after treatment with flavanol.

Concurrent with the increase in myogenic proteins, Epi generated hypertrophy in the tibial muscles 15 days after the damage. An element that could participate in muscle growth is activating the PI3K/AKT signaling pathway through the induction of protein synthesis [44,45]. Previous studies of our group have shown that

the activation of the PI3K/AKT signaling by Epi induces adaptative hypertrophy in cardiomyocytes of normal mice [27]. Therefore, we are currently conducting research to determine if the PI3K/AKT signaling is involved in skeletal muscle hypertrophy.

Previous studies of our group have shown that Epi improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic mice  $\delta$ -sarcoglycan null mouse skeletal muscle [23]. Likewise, in patients with Type 2 diabetes, Epi-rich cocoa induces recovery/enhancement of associated proteins dystrophin complex, the sarcomeric microstructure, and modifies SkM markers compatible with myofiber regeneration [24].

Overall, this study shows that Epi accelerates the repair process, which was associated with increased  $\beta$ -catenin and myogenic protein such as MyoD and Myogenin in a chemically injured SkM; however, more experiments should be carried out to elucidate more deeply the effect that Epi may have on the  $\beta$ -catenin pathway and other signal pathways. It is also worth highlighting the therapeutic potential of flavanol in acquired and genetic myopathies, positively impacting different molecular mechanisms. In addition, some studies have shown that Epi has no adverse effects on humans at the doses used in this study [46,47].

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Acknowledgments

Magally Ramírez Ramírez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and has received CONACYT fellowship 604362. This study was supported by CONACYT grant 774643.

#### Author contributions

CVRM and RRM participated in the design of the study, wrote and reviewed the manuscript, FVF, ZDA, MDMG, RGA, CMLJ, and RRM carried out experiments and analyzed the data. All authors contributed to the editing and had final approval of the submitted version.

#### References

- [1] Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2003;84(1):209–38. doi:10.1152/physrev.00019.
- [2] Judson RN, Fabio FMV. Towards stem cell therapies for skeletal muscle repair. *Regenerative Medicine* 2020;5:10. doi:10.1038/s41536-020-0094-3.
- [3] Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010;120(1):11–19. doi:10.1172/JCI40373.
- [4] Randolph M, Pavlath G. A muscle stem cell for every muscle: variability of satellite cell biology among different muscle groups. *Front. Aging Neurosci* 2015;7:190. doi:10.3389/fnagi.2015.00190.
- [5] Cui S, Li L, Yu RT, Downes M, Evans RM, Hulin JA, et al.  $\beta$ -catenin is essential for differentiation of primary myoblasts via cooperation with MyoD and  $\alpha$ -catenin. *Development* 2019;146(6):dev167080. doi:10.1242/dev.167080.
- [6] Calve S, Simon HG. Biochemical and mechanical environment cooperatively regulate skeletal muscle regeneration. *FASEB J* 2012;26(6):2538–45. doi:10.1096/fj.11-200162.
- [7] Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration and repair in the muscular dystrophies. *Annu. Rev. Physiol* 2009;71:37–57. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163216.
- [8] D'Souza DM, Al-Sajeeh D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front. Physiol* 2013;4:379. doi:10.3389/fphys.2013.00379.
- [9] Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HHCM, van Loon LJC. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292(1):E151–7. doi:10.1152/ajpendo.00278.2006.
- [10] Stearns-Reider K, D'Amore A, Beezhold K, Rothrauff B, Cavalli L, Wagner W, et al. Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion. *Aging Cell* 2017;16(3) 518–8. doi:10.1111/acel.12578.

- [11] Rathbone CR, Yamanouchi K, Nevoret-Bell C, Rhoads R, Allen R. Effects of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. *J Muscle Res Cell Motil* 2011;32(2):99–109. doi:10.1007/s10974-011-9255-8.
- [12] Guitart M, Lloreta J, Mañas-García L, Barreiro E. Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. *J Cell Physiol* 2017;233(5):4360–72. doi:10.1002/jcp.26282.
- [13] Bauer R, MacGowan G, Blain A, Bushby K, Straub V. Steroid treatment causes deterioration of myocardial function in the  $\delta$ -sarcoglycan-deficient mouse model for dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 2008;79(4):652–61. doi:10.1093/cvr/cvn131.
- [14] Li ZB, Zhang J, Wagner KR. Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *Journal of Cell Science* 2012;25:3957–65 Pt 17. doi:10.1242/jcs.090365.
- [15] Liu X, Zhen Zhou Y, Chen Y, Chen P, Xiao W. BMSC Transplantation aggravates inflammation, oxidative stress, and fibrosis and impairs skeletal muscle regeneration. *Front Physiol* 2019;10:87. doi:10.3389/fphys.2019.00087. eCollection 2019.
- [16] Filareto A, Parker S, Darabi R, Borges L, Iacovino M, Schaaf T, et al. An ex vivo Gene Therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013;4:1549. doi:10.1038/ncomms2550.
- [17] Albuquerque MAV, Abath-Neto O, Maximino JR, Chadi G, Zanoteli E, Reed UC. Clinical aspects of patients with sarcoglycanopathies under steroids therapy. *Arq Neuropsiquiatr* 2014;72(10):768–72. doi:10.1590/0004-282x20140126.
- [18] Houang EM, Haman KJ, Filareto A, Perlingeiro RC, Bates FS, Lowe DA, et al. Membrane-stabilizing copolymers confer marked protection to dystrophic skeletal muscle in vivo. *Methods & Clinical Development* 2015;2:15042. doi:10.1038/mtdm.2015.42. eCollection 2015.
- [19] Rinaldi F, Zhang Y, Mondragon-Gonzalez R, Harvey J, Perlingeiro RCR. Treatment with rGDF11 does not improve the dystrophic muscle pathology of mdx mice. *Skeletal Muscle* 2016;6:21. doi:10.1186/s13395-016-0092-8. eCollection 2016.
- [20] Ottaviani J, Borges G, Momma TY, Spencer JPE, Keen CL, Crozier A, et al. The metabolome of [2-14C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Scientific Reports* 2016;6:29034. doi:10.1038/srep29034.
- [21] Shay J, Elbaz HA, Lee I, Zielske SP. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015;181260. doi:10.1155/2015/181260.
- [22] McDonald CM, Ramirez-Sanchez I, Oskarsson B, Joyce N, Aguilar C, Nicorici A, et al. (-)-Epicatechin induces mitochondrial biogenesis and markers of muscle regeneration in adults with Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2021;63(2):239–49 v. doi:10.1002/mus.27108.
- [23] Ramirez-Sanchez I, De los Santos S, Gonzalez-Basurto S, Canto P, Mendoza-Lorenzo P, Palma-Flores C, et al. (-)-Epicatechin improves mitochondrial related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic delta sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J* 2014;281(24):5567–80. doi:10.1111/febs.13098.
- [24] Taub PR, Ramirez-Sanchez I, Ciarald TP, Gonzalez-Basurto S, Coral-Vazquez R, Perkins G, et al. Perturbations in skeletal muscle sarcomere structure of heart failure and type 2 diabetes patients: Restorative effects of (-)-epicatechin-rich cocoa. *Clinical Science* 2013;125(8):383–9. doi:10.1042/CS20130023.
- [25] Tierney MT, Sacco A. Inducing and evaluating skeletal muscle injury by no-texin and barium chloride. *Methods Mol Biol* 2016;1460:53–60. doi:10.1007/978-1-4939-3810-0\_5.
- [26] Bloemberg D, Quadrilatero J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35273. doi:10.1371/journal.pone.0035273.
- [27] De los Santos S, García-Pérez V, Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, González-Gutiérrez CJ, Zazueta C, et al. (-)-Epicatechin induces physiological cardiac growth by activation of the pi3k/akt pathway in mice. *Molecular Nutrition and Food Research* 2017;61(2):1–10 doi:10.1002/mnfr.201600343, 2017.
- [28] Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS ONE* 2016;11(1):e0147198. doi:10.1371/journal.pone.0147198.
- [29] Pallafacchina G, Blaauw BG, Schiaffino S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23(Suppl 1):S12–18. doi:10.1016/j.numecd.2012.02.002.
- [30] Roberta S, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun* 2021;12(1):330. doi:10.1038/s41467-020-20123-1.
- [31] Guerrieri D, Moon HY, van Praag H. Exercise in a Pill: The latest on exercise-mimetics. *Brain Plast* 2017;2(2):153–69. doi:10.3233/BPL-160043.
- [32] Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA, Gundersen K. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(34):15111–16. doi:10.1073/pnas.0913935107.
- [33] Mohammad NS, Nazli R, Zafar H, Fatima S. Effects of lipid based Multiple Micronutrients Supplement on the birth outcome of underweight pre-eclamptic women: A randomized clinical trial. *Pak J Med Sci* 2022;38(1):219–26. doi:10.12669/pjms.38.1.4396.
- [34] Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem* 2008;283(28):19371–8. doi:10.1074/jbc.M802585200.
- [35] Bernardi H, Gay S, Fedon Y, Vernus B, Bonniou A, Bacou F. Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300(5):C1122–38. doi:10.1152/ajpcell.00214.2010.
- [36] Jung HW, Choi JH, Jo T, Shin H, Suh JM. Systemic and local phenotypes of barium chloride induced skeletal muscle injury in mice. *Ann Geriatr Med Res* 2019;23(2):83–9. doi:10.4235/agmr.19.0012.
- [37] Liang XH, Liu ZJ, Sun JH, Dong ZX, Lu J, Jiang ML. Expression of Wnt/ $\beta$ -catenin related genes after skeletal muscle contusion. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(2):704–11 eCollection 2018.
- [38] Han S, Cui C, He H, Shen X, Chen Y, Wang Y, et al. Myoferlin regulates wnt/ $\beta$ -catenin signaling-mediated skeletal muscle development by stabilizing dishevelled-2 against autophagy. *Int J Mol Sci* 2019;20(20):5130. doi:10.3390/ijms20205130.
- [39] Huraskin D, Eiber N, Reichel M, Zidek LM, Kravic B, Bernkopf D, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling via Axin2 is required for myogenesis and, together with YAP/Taz and Tead1, active in Ila/Ilx muscle fibers. *Development* 2016;143(17):3128–42. doi:10.1242/dev.139907.
- [40] Tripathi S, Miyake T, McDermott JC. Smad7-beta-catenin complex regulates myogenic gene transcription. *Cell Death Dis* 2019;10(6):387. doi:10.1038/s41419-019-1615-0.
- [41] Goh Q, Millay DP. Requirement of myomaker-mediated stem cell fusion for skeletal muscle hypertrophy. *eLife* 2017;6:e20007. doi:10.7554/eLife.20007.
- [42] Armstrong D, Esser K. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(4):C853–9. doi:10.1152/ajpcell.00093.2005.
- [43] Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2017;72:19–32. doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.011.
- [44] Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3(11):1014–19. doi:10.1038/ncb1101-1014.
- [45] Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, et al. Differentiation stage-specific inhibition of the raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 1999;286(5445):1738–41. doi:10.1126/science.286.5445.1738.
- [46] Haskell-Ramsay CF, Schmitt J, Actis-Goretti L. The impact of epicatechin on human cognition: the role of cerebral blood flow. *Nutrients* 2018;10(8):986. doi:10.3390/nu10080986.
- [47] Esser D, Geleijnse JM, Matulalupawu JC, Dower JI, Kromhout D, Hollman, et al. Pure flavonoid epicatechin and whole genome gene expression profiles in circulating immune cells in adults with elevated blood pressure: A randomised double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS ONE* 2011;3(4):e0194229. doi:10.1371/journal.pone.0194229.