

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biotecnología Marina**

---

**Papel del receptor a estrógenos GPER en los efectos de  
la (-)-epicatequina sobre la biogénesis mitocondrial  
en células C2C12**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Adriana Miranda Cervantes**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Adriana Miranda Cervantes**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Carolina Álvarez Delgado**  
Directora de tesis

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dr. Aldo Moreno Ulloa**

**Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro**



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Adriana Miranda Cervantes© 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Adriana Miranda Cervantes** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

**Papel del receptor a estrógenos GPER en los efectos de la (-)-epicatequina sobre la biogénesis mitocondrial en células C2C12**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Carolina Álvarez Delgado  
Directora de Tesis

Se ha evidenciado la capacidad de (-)-epicatequina ((-)-EPI) de estimular la biogénesis mitocondrial (BiM) en el músculo esquelético (ME) en ratones. Sin embargo, los mecanismos por los cuales (-)-EPI promueve dichos efectos permanecen desconocidos. Previamente se ha identificado el papel de un receptor a estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) en la modulación de los efectos cardiovasculares de (-)-EPI. Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo es que el GPER media (al menos parcialmente) los efectos estimulatorios de (-)-EPI sobre la BiM en células de ME. Para comprobar la hipótesis se utilizó un modelo *in vitro* de células de mioblastos de ME de ratón (C2C12), los cuales se diferenciaron a miotubos. Mediante microscopia confocal se identificó la presencia del GPER en la superficie celular y el citoplasma en miotubos C2C12. Los miotubos se trataron con (-)-EPI a distintas concentraciones (3-10  $\mu$ M) y se obtuvo como resultado la estimulación de la BiM, incremento la membrana interna mitocondrial (MitoTracker Green FM, tinción de fluorescencia), incremento en la membrana externa (niveles de la proteína porina), aumento en factores de transcripción involucrados en la estimulación de la BiM (Factor de respiración nuclear 2 NRF-2, factor de transcripción mitocondrial A , TFAM) , así como los niveles de actividad de la enzima citrato sintasa. Sumado a estos efectos se observó que los miotubos tratados con (-)-EPI mostraron mayor longitud y ancho comparado con el grupo control. Los efectos de (-)-EPI sobre la mitocondria de los miotubos y el tamaño celular fueron mayores que aquéllos observados con el agonista del GPER G-1. El uso de un antagonista selectivo de GPER, G-36, evidencio un bloqueo parcial de los parámetros medidos tras la estimulación con (-)-EPI o G-1. De tal manera estos resultados indican que el GPER se expresa en células musculares y media al menos parcialmente los efectos estimulatorios de (-)-EPI sobre la BiM. Por lo tanto, la activación de GPER puede contribuir a los efectos estimulatorios de (-)-EPI E sobre la estructura y función del ME.

**Palabras clave:** Músculo esquelético (ME), (-)-epicatequina (-)-EPI, biogénesis mitocondrial, GPER, sarcopenia.

Abstract of the thesis presented by **Adriana Miranda cervantesas** a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

**Role of estrogen receptor GPER in the effects of (-)-Epicatechin on mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes**

Abstract approved by:

---

Dra. Carolina Álvarez Delgado  
Thesis Director

Skeletal muscle (SkM) represents ~40% of the total body mass and plays an important role in locomotion, thermogenesis and energy balance. Aging/disease-associated sarcopenia is the progressive loss of SkM strength and mass linked to a decrease in SkM mitochondrial function and biogenesis (MB, synthesis of new mitochondria). Sarcopenia is associated with lower quality of life and increased mortality and there is no specific pharmacological treatment. Thus, it is crucial to find new molecules to treat the disease. (-)-Epicatechin ((-)-EPI), a natural cacao flavanol, has been shown to increase SkM strength and function in animals and humans; these effects are associated to the modulation of SkM mitochondrial function. However, the exact mechanism by which (-)-EPI exerts its effects on SkM remains unknown. The G-protein coupled estrogen receptor (GPER) binds and signals via 17- $\beta$  estradiol, an estrogen that is structurally similar to (-)-EPI. The aim of this work was to evaluate the role of GPER in mediating (-)-EPI effects on MB and function using C2C12 myotubes as a model of SkM. Methods: GPER presence in myotubes was evaluated by confocal microscopy. Cells were treated with increasing concentrations of (-)-EPI (1-10  $\mu$ M) for 48 h. We evaluated MB by mitochondrial staining with MitoTracker® Green and quantification of protein levels of complex II, IV and nuclear respiratory factor 2 (NRF-2). Mitochondrial function was studied by quantification of citrate synthase and MTT activity. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA or Student's t-test, as appropriate. Results: data indicate that GPER is localized at the cell membrane and cytoplasm and that 10  $\mu$ M (-)-EPI significantly increased MB (20-50 %) and function endpoints (15-20 %) compared to non-treated cells; effects were blocked by G36 (GPER antagonist). Conclusion: evidence suggests that (-)-EPI effects on SkM mitochondria are mediated by GPER and highlight this receptor as a potential therapeutic candidate for the treatment of aging/disease-associated sarcopenia.

**Key words:** Skeletal muscle, mitochondrial biogenesis, (-)-epicatechin, GPER, sarcopenia.

## Dedicatorias

Con todo mi cariño, respeto y admiración

Gracias a mis padres Marisol y Enrique, por preocuparse por mi educación, a mi hermana por ser un gran ejemplo, por todo su apoyo y enseñanzas , gracias por confiar en mí, jamás los decepcionaré.

Gracias a mi familia por estar pendiente en todo momento. A Bety, Vero y Enrique.

A Caro, no sólo mi jefa, una gran amiga y excelente persona, gracias por darme la oportunidad de estar aquí, por tus consejos académicos y personales.

Al Dr. Aldo Moreno Ulloa le agradezco el voto de confianza y su amistad.

A mi equipo de trabajo durante estos dos años.

A Erika y Arlette por ser las primeras amigas en Ensenada.

A mis amigos de la vida, gracias porque aunque están lejos siempre nos mantenemos cerca, Anto, Gaby, Diana.

A mis amigos de Ensenada, gracias por estar aquí, a Caro por escucharme siempre, a Marce por fortalecerme no sólo físicamente, a las poleras amazonas Aimie, Sheila, Erika, Adri, por todas las risas.

## Agradecimientos

Agradezco al CICESE por mi estancia estos dos años, por aceptarme en el programa de posgrado en Ciencias de la Vida.

Gracias al Departamento de Innovación Biomédica por el uso de las instalaciones y los servicios durante la realización de este trabajo, así como a la planta de investigadores del mismo.

Gracias al departamento de medicina de UCSD y al Dr. Francisco Villareal por el material y reactivos para la realización de este proyecto.

Gracias a mi comité tutorial. A mi directora la Dra. Carolina Álvarez por invitarme a su equipo de trabajo, sus valiosos comentarios y sus enseñanzas.

Al Dr. Aldo Moreno Ulloa por permitirme formar parte de este proyecto y por sus enseñanzas.

A la Dra. Carmen Paniagua y al Dr. Alexei Licea gracias por su tiempo y sus comentarios con el fin de enriquecer este trabajo.

Por último gracias a CONACyT por la beca de manutención 689499 para realizar este posgrado.

## Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Estructura del músculo esquelético (ME) .....	1
1.1.2 Funciones del ME.....	2
1.1.3 Mitocondria .....	4
1.1.4 Mitocondria y ME .....	5
1.1.5 Ejercicio y ME.....	6
1.1.6 Biogénesis mitocondrial .....	6
1.1.7 Patologías asociadas al ME .....	8
1.1.8 Sarcopenia .....	9
1.1.9 Terapia .....	10
1.1.10 Generalidades del cacao.....	10
1.1.11 Evidencia de los efectos positivos de la cocoa en la salud .....	11
1.1.12 Cocoa y polifenoles.....	12
1.1.13 (-)- Epicatequina .....	13
1.1.14 Receptores acoplados a proteínas G .....	15
1.1.15 Proteínas G .....	17
1.1.16 GPER .....	17
<b>1.2 Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Hipótesis .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Objetivos .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Objetivo general .....	21
1.4.2 Objetivos particulares.....	21
<b>Capítulo 2. Metodología .....</b>	<b>22</b>
2.1 Cultivo de la línea celular C2C12 .....	22
2.2 Diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos .....	22
2.3 Inmunofluorescencia .....	22
2.4 Tratamiento de las células .....	23
2.5 Viabilidad celular .....	23
2.6 Morfología celular .....	24
2.7 Análisis de la biogénesis mitocondrial.....	24
2.8 Determinación de la densidad mitocondrial.....	25
2.9 Extracción de proteínas .....	25
2.10 Western blot .....	26

2.11 Ensayo de la enzima citrato sintasa.....	26
2.12 Análisis de la abundancia mitocondrial.....	27
2.13 Inhibición del GPER mediante siRNA.....	28
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>29</b>
3.1 Proceso de diferenciación mioblastos a miotubos en células C2C12.....	29
3.2 Evaluación de la presencia del GPER en miotubos C2C12.....	31
3.3 Análisis de los efectos de los ligandos sobre la viabilidad celular.....	31
3.4 Análisis de los efectos de los ligandos sobre la morfología celular.....	33
3.5 Concentración respuesta de (-)-EPI sobre marcadores de BiM.....	35
3.6 Efectos inhibitorios de G-36 en la BiM inducida por (-)-EPI.....	37
3.7 Efectos inhibitorios de siRNA-GPER sobre la biogénesis mitocondrial inducida por siRNA.....	42
3.8 Posible mecanismo de acción del (-)-EPI a través del GPER.....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>Literatura Citada.....</b>	<b>49</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Estructura general de una fibra muscular. ....	<b>2</b>
<b>Figura 2</b> Proceso de diferenciación muscular y los marcadores clave de cada etapa .....	<b>3</b>
<b>Figura 3</b> Estructura general de la mitocondria.....	<b>4</b>
<b>Figura 4</b> Complejos proteicos de la cadena respiratoria.....	<b>5</b>
<b>Figura 5.</b> Rutas de la BiM.....	<b>8</b>
<b>Figura 6.</b> Planta del cacao.....	<b>11</b>
<b>Figura 7.</b> Clasificación general de los polifenoles .....	<b>13</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la (-)-epicatequina .....	<b>15</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura de un GPCR .....	<b>16</b>
<b>Figura 10.</b> Activación de un GPCR .....	<b>17</b>
<b>Figura 11</b> Localización y roles fisiológicos en distintos sistemas del GPER..... ¡Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 12.</b> Proceso de diferenciación con respecto al tiempo de mioblastos a miotubos C2C12. ....	<b>30</b>
<b>Figura 13.</b> Localización del GPER en miotubos C2C12 .....	<b>31</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto de los ligandos sobre la viabilidad de miotubos C2C12.....	<b>32</b>
<b>Figura 15.</b> Efectos de los ligandos sobre la morfología celular en miotubos C2C12. ....	<b>33 y 34</b>
<b>Figura 16 .</b> Concentración respuesta de (-)-EPI sobre proteínas indicadoras de BiM .....	<b>36</b>
<b>Figura 17 .</b> Concentración respuesta de (-)-EPI sobre la actividad de la citrato sintasa.. ....	<b>38</b>
<b>Figura 18.</b> Análisis del efecto inhibitorio de G-36 en los efectos de BiM inducida por (-)-EPI .....	<b>39</b>
<b>Figura 19.</b> Análisis del efecto inhibitorio de G-36 en los efectos de BiM inducida por (-)-EPI sobre la actividad de la enzima citrato sintasa .....	<b>40</b>
<b>Figura 20.</b> Análisis de los efectos de (-)-EPI sobre la BIM en miotubos.....	<b>41</b>
<b>Figura 21.</b> Comprobación de a transfección del GPER (siRNA).....	<b>42</b>
<b>Figura 22.</b> Análisis de Mitotracker Red en miotubos C2C12 tratados con siRNA-GPER .....	<b>43</b>
<b>Figura 23.</b> Posible mecanismo de (-)-EPI a través del GPER.....	<b>47</b>

## **Lista de tablas**

**Tabla 1. Preparación de las muestras para ensayo de la enzima citrato-sintasa .....27**

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Estructura del músculo esquelético (ME)

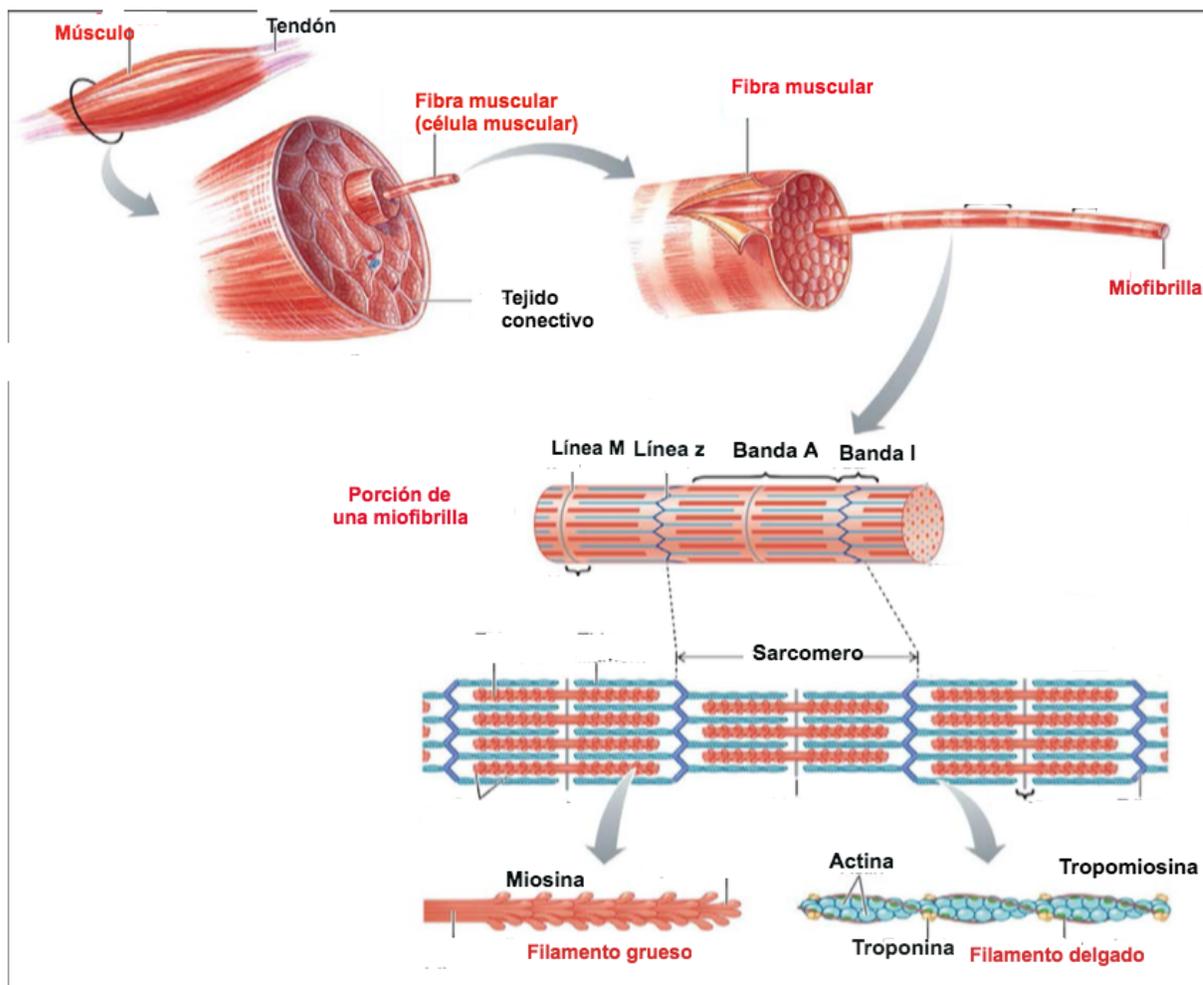
El ME realiza diversas funciones y es el tejido más abundante, ya que representa aproximadamente 40% del peso corporal total en humanos. Tiene un papel central en la locomoción (fuerza y movimiento); termogénesis (generación de calor); el abastecimiento de energía, ya que es un almacén importante de glucógeno y aminoácidos; y la protección contra la resistencia a la insulina (Brioche et al., 2016). Está compuesto principalmente de agua (75%), proteína (20%) y otras sustancias como sales, minerales, grasa y carbohidratos (Frontera & Ochala, 2015).

Es un tejido con gran plasticidad que se adapta a las diferentes etapas de la vida. Por ejemplo, en la niñez y adolescencia hay un incremento en la masa y fuerza muscular, mientras que después de los 30 años hay un decremento natural en estos parámetros. Además, es sensible a diversos estímulos externos como el ejercicio, las hormonas, algunas enfermedades y el estatus nutricional. Las rutas energéticas básicas en el ME son almacenar glucógeno, glicólisis anaerobia y fosforilación oxidativa (Brioche et al., 2016).

La arquitectura del ME consta de un arreglo de células musculares en forma de fibras o miofibras unidas por tejido conectivo. Estas miofibras miden aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1 cm de largo y están rodeadas por una membrana (sarcolema). El tamaño de los músculos está determinado por el número y tamaño de las fibras individuales. Cada miofibra es una unidad cilíndrica multinucleada que genera fuerza y contracción. Los núcleos de las fibras controlan diferentes regiones de la célula (dominios celulares) y se encargan de la síntesis de proteínas específicas (Figura 1) (Frontera & Ochala, 2015). Cada miofibra tiene proteínas contráctiles, reguladoras y citoesqueléticas agrupadas en sarcómeros (unidad contráctil del ME) que contienen filamentos de actina y miosina. Estas proteínas interactúan entre sí para producir fuerza y movimiento (Relaix & Zammit, 2012).

El ME en humanos es altamente heterogéneo, presenta variabilidad bioquímica, mecánica y metabólica en distintas fibras. Las fibras musculares se clasifican en tres tipos. Las fibras tipo I son pequeñas y generan poca fuerza, pero contienen una alta cantidad de mitocondrias, lo cual las hace resistentes a la fatiga. Las fibras tipo II son largas y contienen una menor cantidad de mitocondrias, generan más fuerza y tienen una menor resistencia a la fatiga. El tercer tipo se denomina fibras híbridas que co-expresan más de una cabeza

de miosina, son glicolíticas y poco resistentes a la fatiga (Carter et al., 2015; Frontera & Ochala, 2015). En un músculo existe la presencia de distintos tipos de fibras, esta diversidad fisiológica es de suma importancia pues permite la participación de un único músculo en actividades con demandas mecánicas y metabólicas diversas (Frontera & Ochala, 2015).

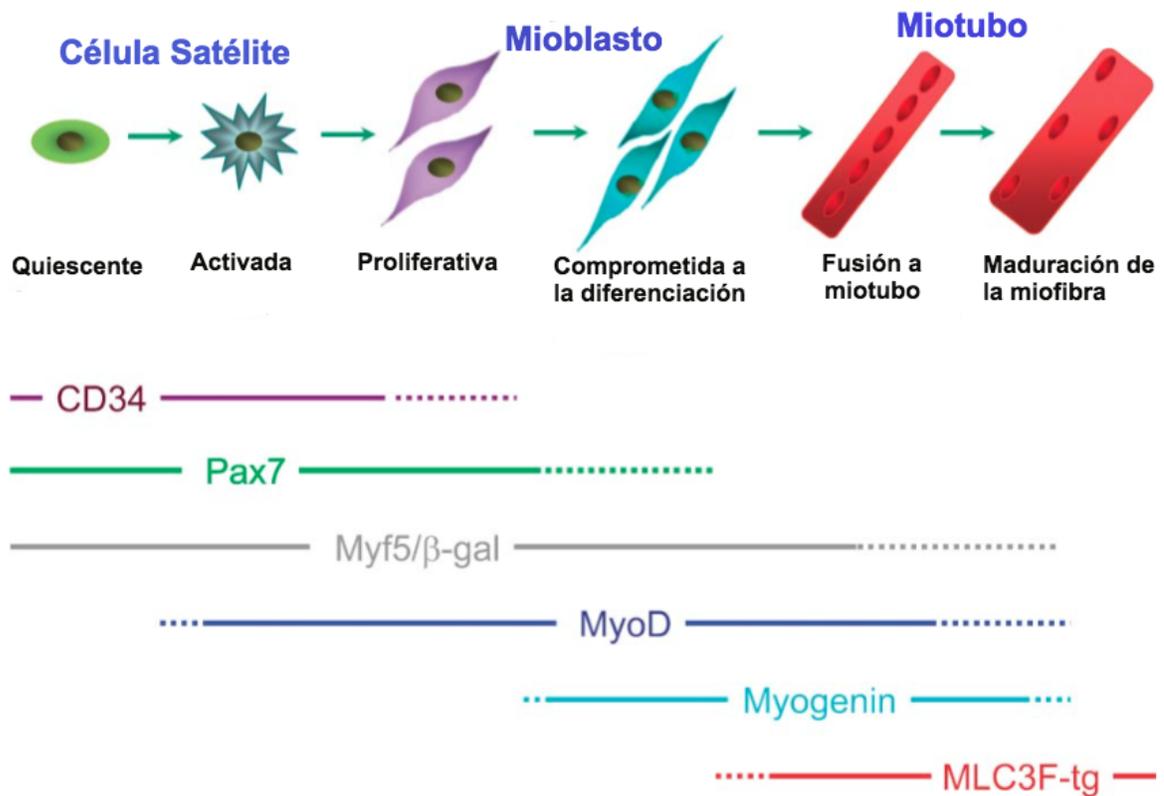


**Figura 1.** Estructura general de una fibra muscular. Muestra los componentes principales del ME (Modificado de Frontera & Ochala, 2015)

### 1.1.2 Funciones del ME

El ME está expuesto a diversos daños físicos. Sin embargo, tiene una alta capacidad regenerativa. La reparación comienza a partir de las células satélite (células madre presentes en el ME de los adultos). Estas células se encuentran en la superficie de la fibra muscular, por debajo de la lámina basal, y son parte de

una población celular heterogénea que contribuye al crecimiento, reparación y regeneración muscular. Las células satélite se diferencian mediante un proceso denominado miogénesis (Figura 2), el cual está regulado por diversas proteínas y hormonas (factores miogénicos como la miogenina, implicada en la diferenciación de mioblastos). Existe un número de células satélite residuales en los músculos adultos, sin embargo, con la edad disminuye su población y, por lo tanto, también se ve afectada la capacidad de regeneración del ME. En ciertas condiciones como estrés o daño muscular, las células satélite proliferan, se diferencian y se fusionan para reparar el músculo dañado (Frontera & Ochala, 2015; Mikes et al., 2002; Relaix & Zammit, 2012; Burattini et al., 2004).

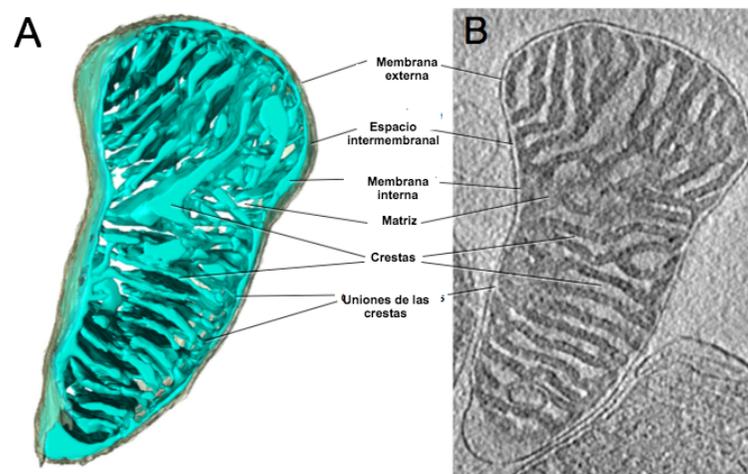


**Figura 2.** Proceso de diferenciación muscular y los marcadores clave de cada etapa. A partir de células satélite los mioblastos se fusionan en miotubos multinucleados. CD34, Pax7 y Myf5/β-gal se expresan en las células satélites quiescentes cuya activación está determinada por el incremento de MyoD. Myogenina y MLC3F-tg son marcadores de los procesos de maduración final (Modificado de Relaix & Zammit, 2012).

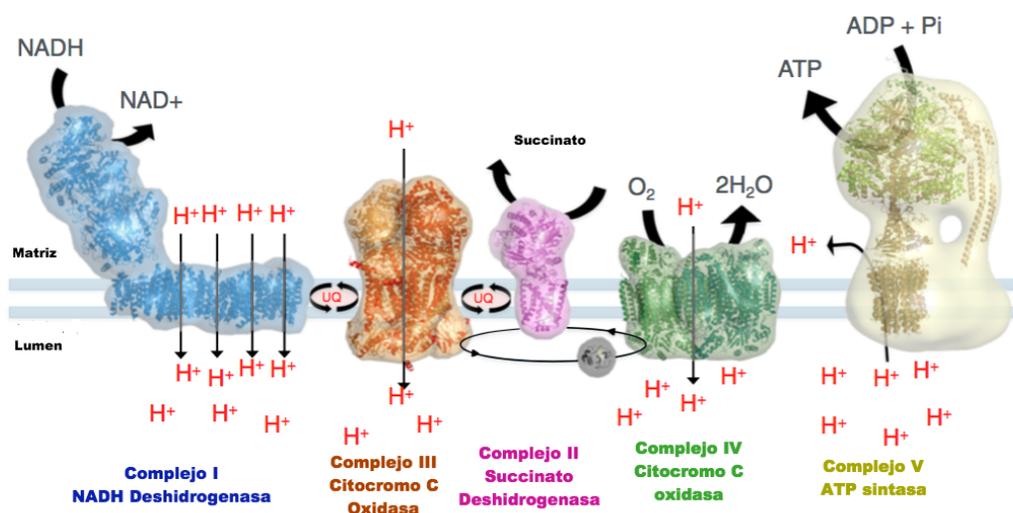
### 1.1.3 Mitocondria

La mitocondria es un organelo cuyo tamaño varía entre 0.5 a 1  $\mu\text{m}$ . Se compone de una membrana externa; el espacio intermembranal; una membrana interna que se pliega en crestas mitocondriales; y la matriz mitocondrial (Figura 3). La mitocondria es un integrador central de distintas señales y procesos celulares, por ejemplo, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Chen et al., 2005); el control de la muerte celular programada; la homeostasis del calcio; el mantenimiento del balance antioxidante y la esteroidogénesis. Este organelo tiene su propio DNA circular de doble cadena que codifica 13 proteínas, 22 tRNAs y 2 rRNAs (Calvo & Mootha, 2010). Sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el DNA nuclear (Dorn et al., 2015).

En el ME las mitocondrias forman una red tridimensional a través de la cual se genera más del 90% de la energía necesaria (ATP) mediante la cadena transportadora de electrones. Esta cadena comprende de 5 complejos proteicos embebidos en la membrana interna mitocondrial, los cuales reciben y donan electrones provenientes de NADH y  $\text{FADH}_2$ . Durante este proceso se genera el gradiente electroquímico necesario para la formación de ATP a partir de la fosforilación de ADP (Figura 4). La combinación de ambos procesos se describe como fosforilación oxidativa (*OXPHOS* del inglés [*oxidative phosphorylation*]) (Bishop et al., 2014).



**Figura 3.** Estructura general de la mitocondria. La Imagen A es una reconstrucción 3D de una mitocondria de músculo señalando la membrana externa, la membrana interna y sus pliegues, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. En el panel B se muestra una imagen de microscopía electrónica donde se observan con detalle las estructuras mitocondriales (Modificado de Kühlbrandt, 2015).



**Figura 4.** Complejos proteicos de la cadena respiratoria. Complejo I (NADH deshidrogenasa, azul) III (citocromo C reductasa, naranja), II (succinato deshidrogenasa, rosa) IV (citocromo c oxidasa, verde), y el complejo V (ATP sintasa amarillo) (Modificado de Kühlbrandt, 2015).

### 1.1.4 Mitocondria y ME

La mitocondria es un regulador principal del metabolismo celular y su función depende tanto de su estructura como de la formación de redes mitocondriales. En los tejidos, incluido el ME, la disposición funcional de las mitocondrias es una red dinámica formada mediante los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Estos procesos dinámicos permiten que la mitocondria comparta componentes como DNA (mtDNA) y degrade mitocondrias dañadas (mitofagia). Por lo tanto, el contenido mitocondrial en una célula es un balance entre la biogénesis (síntesis) y la mitofagia (degradación) (Russell et al., 2014).

Diversos estudios en humanos y animales sugieren que la masa y función mitocondrial disminuyen con la edad. Se ha observado una menor actividad de las enzimas de la cadena respiratoria, así como una disminución en la cantidad de crestas y tamaño de las mitocondrias durante el envejecimiento (Carter et al., 2015; Hutter et al., 2004; Miquel et al., 1980). Algunas de estas alteraciones están asociadas a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), daño al DNA y un control de calidad mitocondrial defectuoso durante el proceso de biogénesis.

Por otra parte, se sabe que en el envejecimiento hay menor regeneración muscular y mayor apoptosis. Además, con la edad disminuye la eficacia transcripcional de los miofibrilos, lo cual limita la incorporación de núcleos en las fibras musculares y afecta la capacidad de reparación (Hutter et al., 2004).

### **1.1.5 Ejercicio y ME**

Se ha visto que la práctica regular de ejercicio en pacientes con enfermedades relacionadas al estilo de vida (e.g., diabetes tipo 2, osteoporosis, hipertensión, obesidad, cáncer y depresión) tiene efectos positivos, metabólicos y terapéuticos. Existen diversos mecanismos biológicos por los cuales el ejercicio tiene estos efectos positivos sobre enfermedades crónicas (Warburton et al., 2006). Por ejemplo, la actividad física reduce los niveles de triglicéridos; mejora la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina; controla la presión sanguínea; mejora el tono muscular; reduce la inflamación; promueve la función cardíaca; e induce cambios tanto metabólicos como estructurales en los tejidos, principalmente en el ME (Russell et al., 2014).

El ejercicio induce adaptaciones reflejadas en cambios de las proteínas contráctiles en el ME, función mitocondrial, regulación metabólica y señalización intracelular. Las modificaciones post-ejercicio incluyen cambios en la transcripción de reguladores miogénicos; genes del metabolismo de carbohidratos; movilización de lípidos; metabolismo mitocondrial; fosforilación oxidativa y síntesis de nuevas mitocondrias (Egan & Zierath, 2013; Warburton et al., 2006).

### **1.1.6 Biogénesis mitocondrial (BiM)**

La biogénesis mitocondrial (BiM) puede definirse como la división de mitocondrias pre-existentes. Dicho proceso está influenciado por factores como el estrés oxidativo, la demanda energética, la división y proliferación celular, la restricción calórica, la baja temperatura y el ejercicio (Figura 5) (Jornayvaz & François R., 2010).

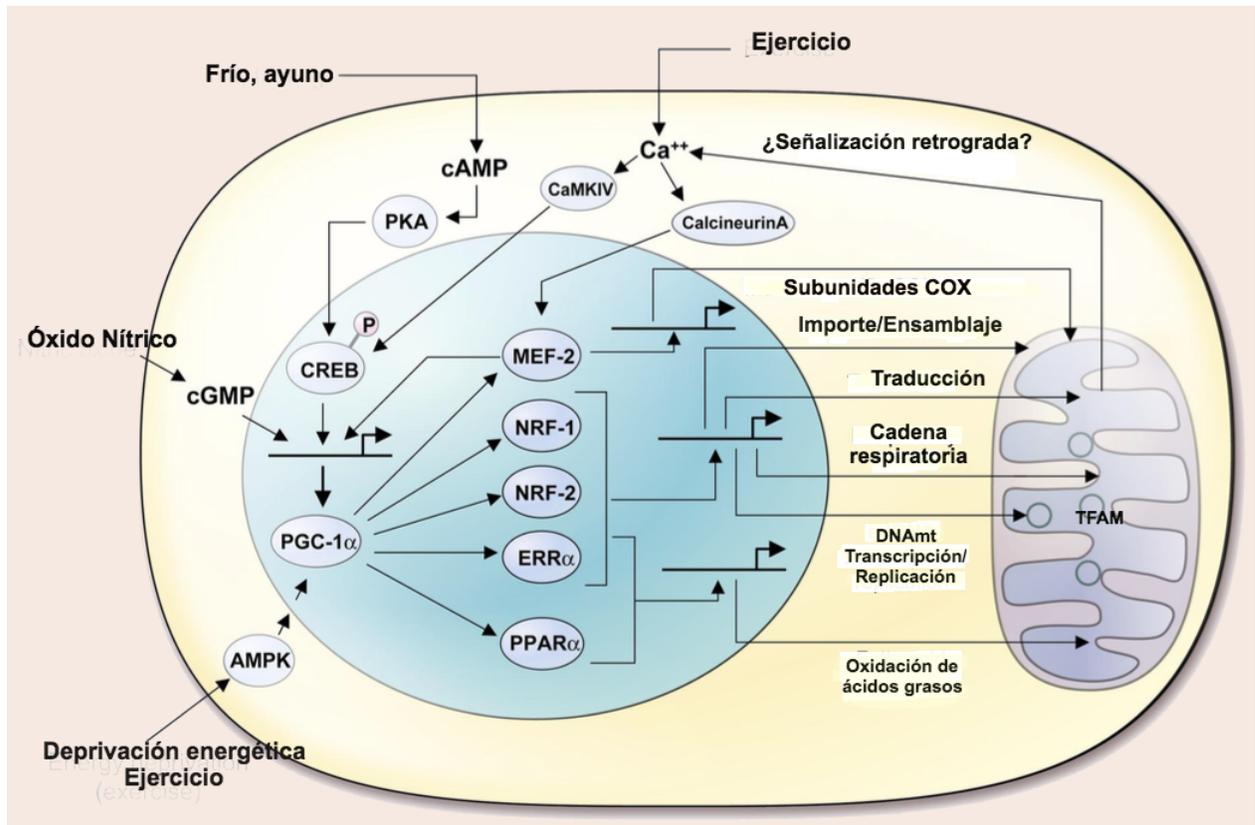
La BiM inducida por el ejercicio altera el contenido, la localización y la actividad de co-activadores y reguladores de la transcripción. Específicamente los reguladores clave de la BiM inducida por ejercicio en

el ME son el co-activador  $1\alpha$  del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas ( PGC- $1\alpha$ ), los factores de respiración nuclear 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2) y el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam). Durante el ejercicio se activa la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), la cual fosforila y activa a PGC- $1\alpha$ . Además, el ejercicio provoca la translocación de PGC- $1\alpha$  desde el citoplasma, donde se encuentra en periodos de reposo, hacia el núcleo y la mitocondria, donde puede activar a Tfam y promover la transcripción del mtDNA (Bishop et al., 2014; Russell et al., 2014).

Existen co-activadores transcripcionales que no se unen al DNA pero promueven la unión de otros factores de transcripción (Hood et al., 2011). Tal es el caso de la familia PGC-1 (PGC- $1\alpha$ , PGC- $1\beta$  y PRC). PGC- $1\alpha$  y PGC- $1\beta$  inducen un incremento de la masa mitocondrial; los componentes de la fosforilación oxidativa; las vías metabólicas mitocondriales; los complejos de importación de proteínas; las proteínas involucradas en fusión/fisión; y las sirtuinas (proteínas dependientes de NAD<sup>+</sup>) (Uldry et al., 2006). Esta familia de co-activadores tiene la capacidad de potenciar la función de otros factores de transcripción como los Receptores relacionados al receptor a estrógenos (ERRs), NRF y Tfam ( Scarpulla, 2008).

La familia de los factores de respiración nuclear (NRF-1 y NRF-2) tiene sitios de unión a distintos genes nucleares involucrados en la función respiratoria, controlan componentes del importe y ensamblaje de la maquinaria de respiración mitocondrial. NRF-2 es un coordinador bigenómico porque activa directamente la expresión de subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas en el núcleo e indirectamente activa subunidades codificadas en el mtDNA (Bruni et al., 2010).

Por otro lado, existen reguladores de la transcripción que se unen directamente al mtDNA, tal es el caso de Tfam. Se une a sitios específicos del mtDNA y también puede unirse aleatoriamente y promueve a la estabilización y mantenimiento del mtDNA.



**Figura 5.** Rutas de la BiM. Imagen que muestra los estímulos externos de la BiM y los co-factores y factores de inicio de la transcripción que son activados, así como las vías de señalización generales. El ejercicio activa la señalización por calcio y AMPK, los cuales a su vez activan PGC-1 $\alpha$  que activa factores clave de la transcripción en el núcleo (MEF-2, NRF-1, NRF2, ERR $\alpha$  Y PPAR $\alpha$ ) (Modificado de Scarpulla, 2008).

### 1.1.7 Patologías asociadas al ME

La distrofia muscular es un grupo de enfermedades diversas, que causan degeneración progresiva de las fibras del músculo esquelético, cuyos síntomas son dolor, discapacidad y en algunos casos la muerte. La causa principal de distintos tipos de distrofia muscular son las mutaciones en genes que codifican para una amplia variedad de proteínas musculares, como las de la matriz extracelular, proteínas asociadas a la membrana y enzimas citoplasmáticas (Jonghyun Shin et al., 2014).

Las enfermedades mitocondriales en el músculo a menudo se manifiestan como defectos en las enzimas de la cadena respiratoria y alteraciones estructurales. Las miopatías mitocondriales pueden deberse a

mutaciones genéticas o pueden surgir como complicaciones de otros padecimientos, por ejemplo, la sarcopenia relacionada al envejecimiento, caquexia en cáncer y diabetes tipo 2 (Russell et al., 2014).

### **1.1.8 Sarcopenia**

El proceso de envejecimiento puede definirse como el conjunto de fenómenos que disminuyen la capacidad funcional y aumentan la incidencia de cambios y condiciones patológicas que aceleran la tasa de mortalidad. Los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento no afectan a todos los individuos de la misma manera (Finch, 1976). Estos cambios están influenciados por factores ambientales y genéticos.

El término sarcopenia fue definido en un principio como la pérdida de músculo relacionada con el envejecimiento y asociada a un decremento en la fuerza, la tasa metabólica, la capacidad aeróbica y, por lo tanto, en la capacidad funcional. Sin embargo, actualmente no existe una única definición de sarcopenia. La siguiente definición fue propuesta en un congreso realizado en 2009 en Roma, Italia. (Roger et al., 2011).

“La sarcopenia se define como la pérdida de músculo asociada al envejecimiento, dicha pérdida es en masa y en función. Es un síndrome complejo asociado a la pérdida de músculo con o sin un incremento de la grasa corporal. Las causas son multivariadas e incluyen desuso, cambio en la función endocrina, enfermedades crónicas, inflamación, resistencia a la insulina y deficiencias nutricionales.”

Dicho proceso inicia a los 30 años con una pérdida del 0.5 al 1% de masa muscular por año y se incrementa después de los 70 años (Carter et al., 2015).

Se ha visto que las mitocondrias de personas en la edad adulta tienen una morfología anormal, menor densidad y menor contenido de mtDNA, así como actividad enzimática reducida, respiración desacoplada y un incremento en el estrés oxidativo. En estas personas se han observado correlaciones entre las mutaciones en el mtDNA, desajustes bioenergéticos y la pérdida muscular; así como una reducción en PGC-1 $\alpha$  y AMPK. Una reducción en estas proteínas sugiere un desbalance en la biogénesis y función mitocondrial lo cual contribuye al decremento en la masa muscular relacionado con la edad (Russell et al., 2014).

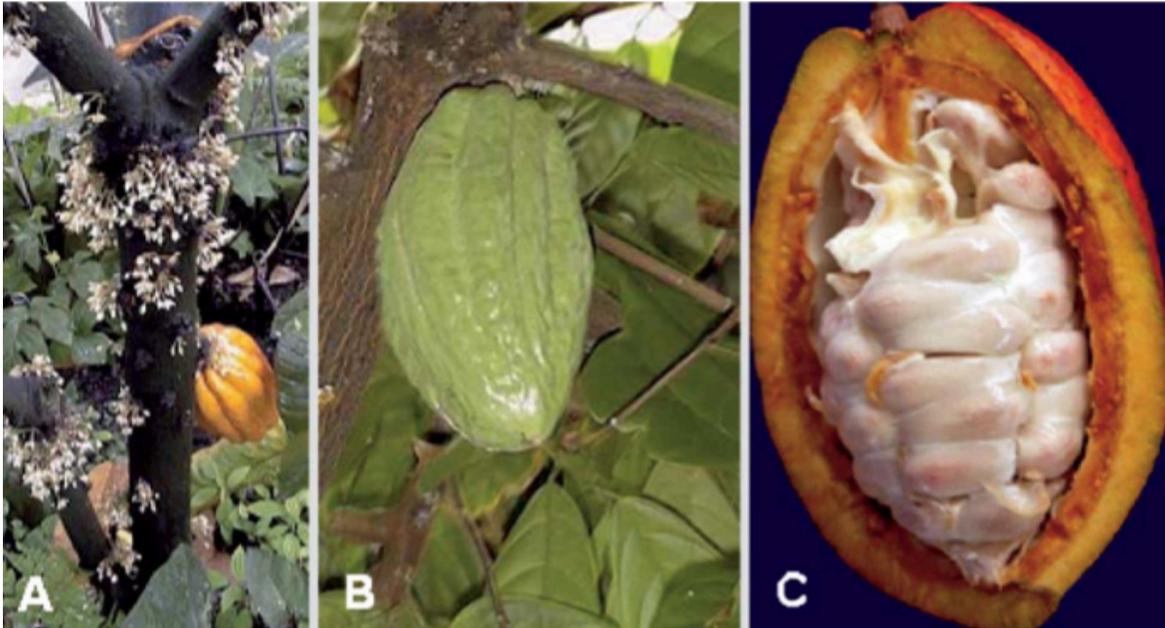
### **1.1.9 Terapia**

En la actualidad la investigación para encontrar un tratamiento eficaz para las patologías musculares se basa en el ejercicio. Esta terapia busca mantener al paciente independiente y retrasar los efectos de la sarcopenia durante el mayor tiempo posible. Esta es la terapia que ha mostrado mejores resultados hasta la fecha. Sin embargo, los tratamientos con fármacos también pueden ser una solución y para ello es importante comprender los mecanismos de la enfermedad y encontrar moléculas que mimeticen o potencien los efectos del ejercicio (Emery, 2002). Durante los últimos años ha habido un interés en los efectos benéficos de los alimentos ricos en polifenoles como el vino, el té y la cocoa como posible tratamiento (Cooper & Sayer, 2012).

### **1.1.10 Generalidades del cacao**

El cacao, *Theobroma cacao*, es un árbol tropical que se distribuye en las partes centrales húmedas de Sur América (Figura 6). El término cacao hace referencia a la planta, mientras que el término cocoa es la bebida o polvo resultante del proceso de fermentación y tostado de la planta. (Colombo et al., 2012)

El cacao tiene sus orígenes en las culturas Maya y Azteca que lo cultivaban y consumían en forma de una bebida denominada *chocolatl*. Esta costumbre era común principalmente en la realeza. Los granos de cacao eran una moneda utilizada por toda la población y eran considerados muy valiosos. Las civilizaciones Olmeca y Maya creían que el cacao tenía un origen divino y lo denominaban la bebida de los dioses. Más aún, Cristóbal Colón la describió como “una bebida divina que aumenta la resistencia y disminuye la fatiga. Una taza de dicha bebida le permite a un hombre caminar por un día entero sin comida.”(Colombo et al., 2012).



**Figura 6.** Planta del cacao .En el panel A se muestra la planta madura de *Theobroma cacao*. En el panel B se muestra el fruto del cacao y en el panel C, un corte longitudinal del fruto que muestra los granos de cacao cubiertos por una capa de mucílago (Bhattacharjee & Kumar, 2007).

La elaboración de la cocoa comienza a partir de la cosecha de las vainas de cacao, posteriormente se remueven los granos de cacao, se fermentan, se secan y se tuestan. El polvo de cocoa contiene la mayor parte de residuos polifenólicos. La cocoa es el componente del licor de cocoa que no tiene grasas; y el chocolate, alimento sólido, es la combinación de la cocoa, mantequilla de cocoa y azúcar (Bhattacharjee & Kumar, 2007; Colombo et al., 2012)

#### **1.1.11 Evidencia de los efectos positivos de la cocoa en la salud**

Durante los últimos años ha habido un interés por el potencial terapéutico de los fitoquímicos, más aún existe un interés por estudiar los efectos benéficos del chocolate y la cocoa sobre la salud. Diversos estudios sugieren que existen compuestos activos benéficos en los productos de chocolate y la cocoa. Los efectos benéficos se han adjudicado principalmente a los polifenoles (Colombo et al., 2012). Principalmente el grupo de los flavan-3-oles. Algunos de los efectos benéficos del consumo de cocoa y

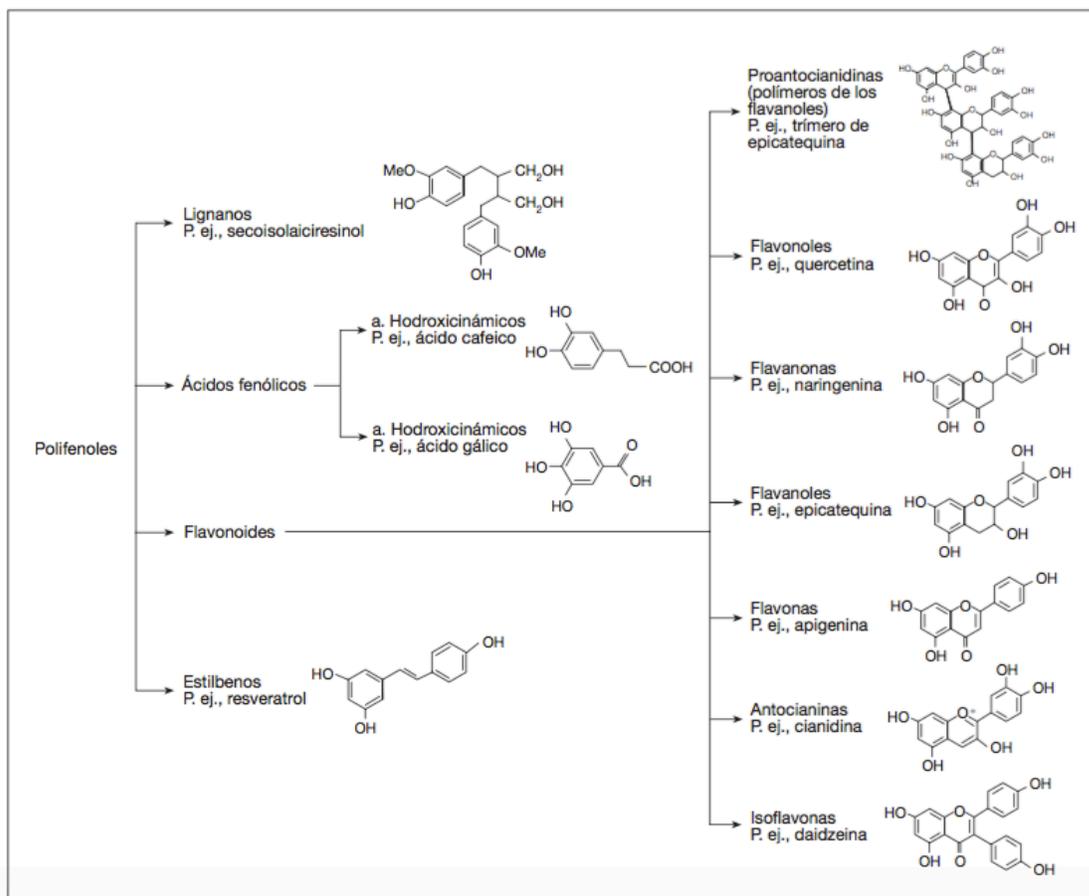
derivados son el mejoramiento de la función endotelial, efectos anti inflamatorios, disminución de los niveles de lípidos y reducción de la presión sanguínea, entre otros (Colombo et al., 2012).

Se ha demostrado que el consumo de cocoa disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e hipertensión. Específicamente, en un estudio se analizaron dos poblaciones de indígenas Kuna en Panamá. Una de las poblaciones es urbana y la otra es isleña y mantiene un estilo de vida rural. La población isleña consume 10 veces más bebidas con cocoa que la población urbana. En dicho estudio se observó que la población isleña no presenta hipertensión ni enfermedades cardiovasculares en comparación con la población urbana. Se piensa que el alto consumo de bebidas hechas con cocoa (alrededor de 6 litros por semana) es uno de los factores responsables de esta diferencia (McCullough et al., 2006).

#### **1.1.12 Cocoa y polifenoles**

La cocoa es rica en polifenoles, minerales, lípidos y otros fitoquímicos. La cantidad de cada uno de estos compuestos varía de acuerdo con el procesamiento que hayan tenido los granos de cacao durante la fermentación de la cocoa (Colombo et al., 2012).

Los polifenoles son un grupo de fitoquímicos abundantes en frutas, vegetales y cereales. En la actualidad existen alrededor de 8000 compuestos polifenólicos descritos (Pandey & Rizvi, 2009) y se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a su número de anillos (ver figura 7). Se ha visto que los polifenoles tienen efectos protectores en distintos ámbitos de la salud humana como enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento. Algunos de los alimentos ricos en polifenoles son el vino, el té y la cocoa. En la cocoa hay alrededor de 120 a 180 g/Kg de compuestos polifenólicos, de los cuales la (-)-epicatequina es el compuesto más abundante y representa un 35% del contenido polifenólico total (Anklam et al. , 2000).



**Figura 7.** Clasificación general de los polifenoles. La tabla muestra la clasificación general de los polifenoles y algunos ejemplos (Modificado de Pascual et al., 2009).

### 1.1.13 (-)- Epicatequina

La (-) epicatequina ((-) –EPI) es un flavanol de la familia de los polifenoles que se encuentra en distintos alimentos incluyendo el cacao. Tiene una estructura de dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos, lo cual representa la estructura típica de un heterociclo oxigenado (Figura 8) (Crozier et al., 2009).

Se han descrito efectos de (-)-EPI en diversos modelos de estudio. Los principales efectos descritos son antioxidantes (Cotelle, 2001), bioenergéticos (Hüttemann et al., 2012; Moreno-Ulloa et al., 2015; Nogueira et al., 2011) y cardiovasculares (McCullough et al., 2006). Los efectos antioxidantes se deben a sus características químicas, las cuales le permiten neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). También se ha visto que puede inhibir enzimas oxidantes e incrementar la expresión de las enzimas antioxidantes (Cotelle, 2001; Moreno-Ulloa, Nogueira, et al., 2015)

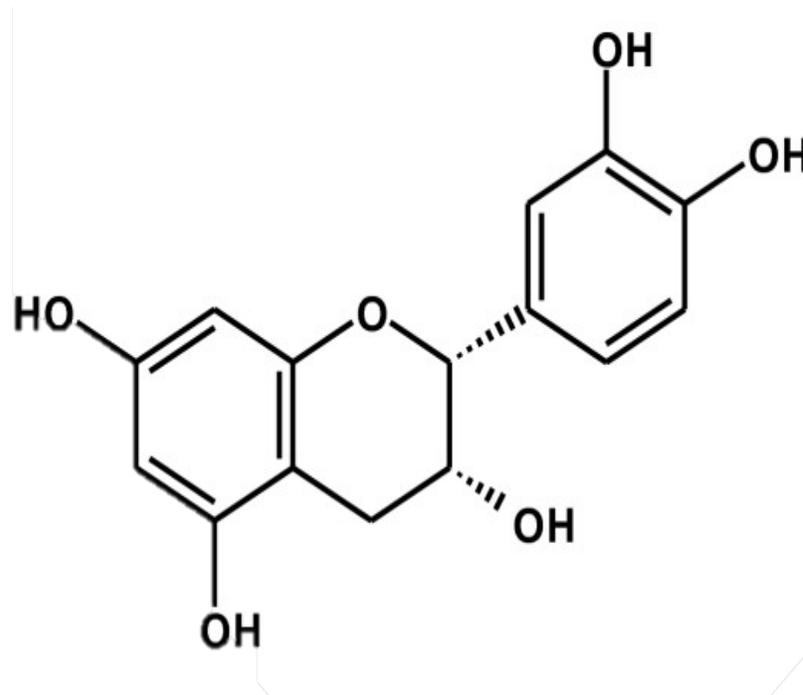
Los efectos cardiovasculares de (-)-EPI se han asociado a la estimulación del óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Se ha visto que el consumo de (-)-EPI (1-2mg/Kg) en humanos iguala los efectos vasculares positivos que proporcionan las bebidas ricas en cocoa, como la dilatación de las arterias (Schroeter et al., 2006). Diversos estudios sugieren que (-)-EPI tiene efectos benéficos en el sistema cardiovascular mediante la producción de NO, mediante la estimulación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la activación de la vía PI3K/AKT y  $Ca^{2+}$ . Dichas vías están relacionadas con la activación de receptores de membrana (Patel, 2004).

En cuanto a los efectos bioenergéticos, en un estudio *in vivo* en ratones macho adultos se analizaron los efectos de (-)-EPI sobre el rendimiento en el ejercicio, la fatiga muscular y la BiM (Nogueira et al., 2011). Específicamente, se demostró que el suministro de una dosis oral baja de (-)-EPI, sola o combinada con ejercicio, durante 14 días promueve la BiM, la abundancia de crestas de la membrana interna y la expresión de proteínas de los complejos proteicos que participan en la fosforilación oxidativa, lo cual se traduce en un potencial incremento de la capacidad energética celular. Estos resultados sugieren que (-)-EPI por sí sola puede mimetizar los efectos del ejercicio en el músculo esquelético.

En otros estudios se ha observado que (-)-EPI mantiene la adaptación al entrenamiento por ejercicio de resistencia en ratones, después de un periodo sin entrenamiento, mediante la estimulación de marcadores de la BiM (Hüttemann et al., 2012). Más aún, se ha demostrado que (-)-EPI aumenta la actividad mitocondrial en modelos en humanos (Barnett et al., 2015).

En 2015, Moreno-Ulloa y colaboradores describieron que los efectos de (-)-EPI sobre la producción de NO en células endoteliales pueden estar mediados por un receptor a estrógenos acoplado a proteínas G, denominado GPER (Moreno-Ulloa, Mendez-Luna, et al., 2015).

Este receptor se ha descrito en distintas líneas celulares como la línea C2C12 de músculo de ratón (Ronda & Boland, 2016).



**Figura 8.** Estructura química de la (-)-epicatequina (Crozier et al., 2009).

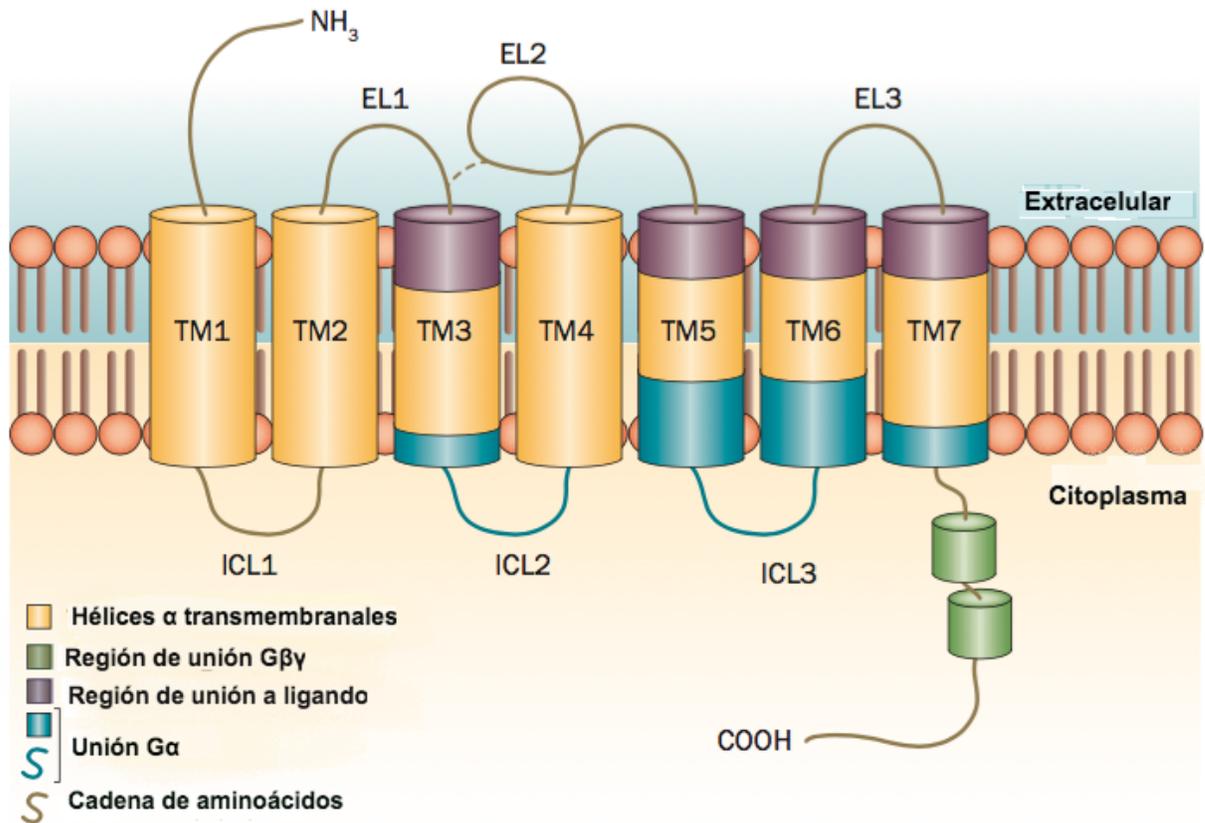
#### 1.1.14 Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son una superfamilia de proteínas integrales de membrana que responden a distintos estímulos como fotones, moléculas y péptidos e inician cascadas de señalización intracelular. Son el grupo de proteínas de membrana más grande en el genoma humano. El funcionamiento de estos receptores involucra la activación de complejos proteicos heterotriméricos, denominados proteínas G (Sanders et al., 2008).

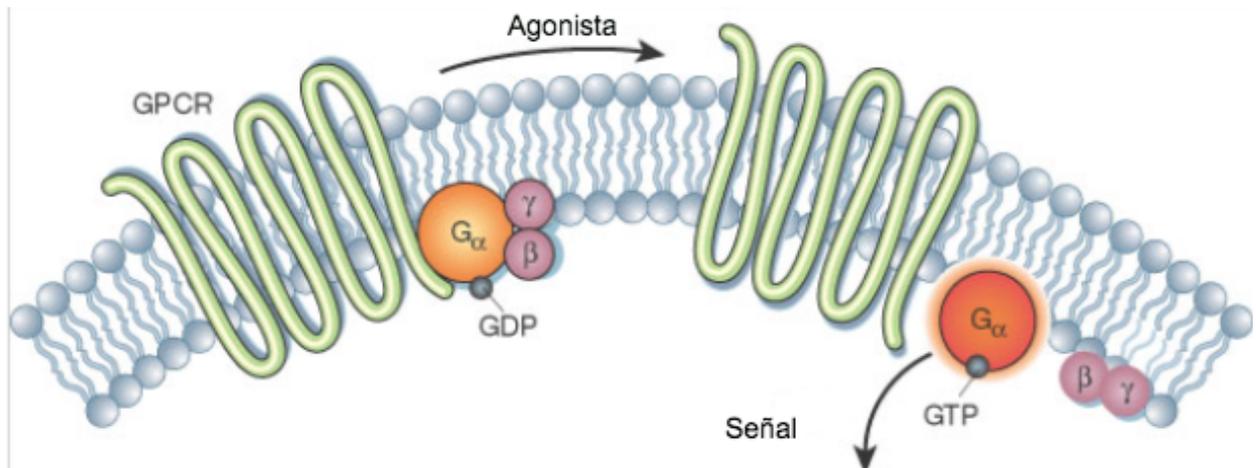
Existen 800 GPCRs los cuales pueden dividirse en la familia de las rodopsinas (701 miembros), los de adhesión (24 miembros), los de gusto (24 miembros), glutamato (15 miembros) y los de secretina (15 miembros) (Kobilka, 2007).

La estructura de los GPCRs consta de siete hélices transmembranales altamente conservadas, tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares. (Robert, 2015; Sanders et al., 2008). Tienen un dominio N-terminal en el lado extracelular y un dominio C-terminal en la parte citoplasmática (Figura 9). Existen 616 miembros funcionales descritos, sin embargo, la mayoría de fármacos actúan a través de solamente 30.

Los GPCRs transducen señales en respuesta a la unión de un agonista, lo cual genera un cambio conformacional en la región citoplasmática (Kobilka, 2007).



**Figura 9.** Estructura de un GPCR. Diagrama de la estructura general de un GPCR que muestra los siete dominios transmembranales, los tres loops extracelulares y los tres loops intracelulares. Así como los extremos amino y carboxilo (Modificada de Neumann, Khawaja, & Müller-ladner, 2014).



**Figura 10.** Activación de un GPCR. Activación de la subunidad  $\alpha$  de una proteína G. La subunidad  $\alpha$  se disocia del complejo  $\beta\gamma$  y se une a GTP

### 1.1.15 Proteínas G

Los GPCRs están acoplados a proteínas G grandes heterotriméricas compuestas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

La subunidad  $\alpha$  tiene un dominio de unión a nucleótidos de guanina, GDP en estado basal. Los ligandos de los GPCRs inducen cambios en la unión de la subunidad  $\alpha$ , la cual reemplaza el GDP por GTP y se disocia de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . Posteriormente el GTP se disocia y las tres subunidades se re-ensamblan. Durante este proceso, las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  permanecen unidas (Figura 10). Las proteínas G activan enzimas de membrana, como adenilato ciclasa o fosfolipasa C, las cuales producen segundos mensajeros (cAMP, diacil glicerol, inositol trifosfato y  $\text{Ca}^{2+}$ ). Estos segundos mensajeros activan distintos tipos de serina/treonina cinasas (Robert, 2015; Sanders et al., 2008).

### 1.1.16 Receptor a estrógenos acoplado a proteínas G (GPER)

Los estrógenos son hormonas esteroides con un papel fisiológico importante tanto en hombres como en mujeres. Regulan la proliferación celular, el crecimiento de los huesos, el tono vascular, la presión

sanguínea, la contractibilidad del miocardio, el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de lípidos (Barton, 2016; Meyer et al. , 2011; Prossnitz & Barton, 2011).

Existen dos receptores a estrógenos denominados clásicos, el receptor a estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y el receptor a estrógenos  $\beta$  (ER $\beta$ ) los cuales tienen diferentes mecanismos de señalización. Se ha demostrado que tienen efectos genómicos e inducen la expresión de diversos genes mediante la formación de dímeros y la unión a elementos de respuesta a estrógenos. También tienen efectos de señalización rápida (no genómicos) que ocurren en segundos o minutos. Esta señalización no involucra la transcripción y síntesis de proteínas *de novo*. ER $\alpha$  y ER $\beta$  se han detectado en distintos tejidos, tienen afinidad por los estrógenos y fitoestrógenos y son activados diferencialmente por éstos (Fu & Simoncini, 2008; Hewitt & Korach, 2002; Levin, 2009).

En 1990 se comenzó a estudiar el aumento de cAMP en respuesta a 17 $\beta$ -estradiol, sin embargo, no se sabía que alguno de los dos receptores clásicos estuviera implicado en este aumento (Barton, 2016). Simultáneamente se describió un receptor acoplado a proteínas G denominado GPR30, dicho receptor no tenía ningún ligando conocido, pero se describió en pulmón, placenta, corazón y sistema reproductivo (Owman et al., 1996; Prossnitz & Barton, 2011). Fue en el año 2000 cuando Filardo y colaboradores describieron la interacción de GPR30 con estrógenos y la subsecuente activación de la vía ERK1/2 con incremento en cAMP (Filardo et al. , 2000).

En el año 2007 la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR, por sus siglas en inglés) renombró al receptor GPR30 como GPER (G-Protein Estrogen Receptor) (Prossnitz & Arterburn, 2015), por lo que a lo largo de este trabajo se nombrará como GPER a este receptor.

Las funciones del GPER se han descrito en el sistema reproductivo, endocrino, urinario, nervioso, inmune, muscular-esquelético y cardiovascular; así como en enfermedades dependientes de estrógenos como algunos tipos de cáncer, osteoporosis y envejecimiento (Barton, 2016; Prossnitz & Barton, 2011).

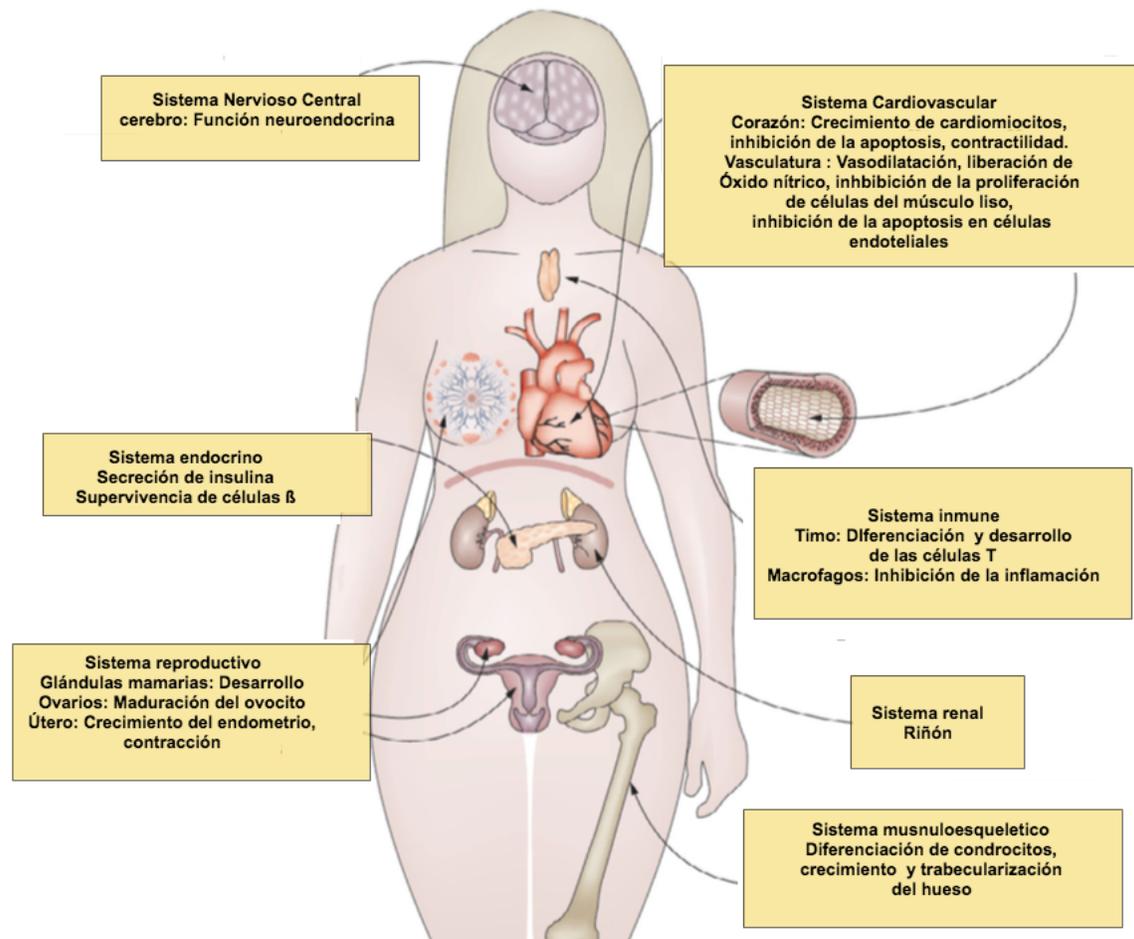
Se ha descrito la unión de distintas moléculas con actividad de agonistas o antagonistas de GPER. Algunas de estas moléculas son hormonas esteroideas naturales (e.g., 17 $\beta$ -estradiol); moduladores selectivos de receptores a estrógenos (e.g., Tamoxifen); fitoestrógenos como la genisteína, resveratrol, catequinas, moléculas sintéticas selectivas (G-15, G-36, G-1), y xenoestrogénos como el bisfenol (Moreno-Ulloa, et al., 2015; Prossnitz & Arterburn, 2015). Estos compuestos han sido usados para estudiar los efectos fisiológicos de GPER en células, tejidos y animales.

GPER tiene efectos directos derivados de su unión a ligandos; sin embargo, también puede tener otros efectos por la comunicación cruzada con otros receptores, como el de vitamina D, glucocorticoides o mineralocorticoides (Barton, 2012; Prossnitz & Barton, 2014). Se sabe que los estrógenos endógenos tienen efectos protectores en el sistema cardiovascular, hipertensión, dislipidemia y diabetes, entre otros (Figura 11). Dichos efectos son mediados por los dos receptores clásicos ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) y por el GPER (Barton, 2016).

Se ha visto que la activación del GPER induce la transactivación del factor de crecimiento epidermal y la estimulación de la vía ERK1/2 y PI3K/AKT/eNOS (Filardo et al., 2000). Hasta el momento el GPER se ha detectado en la membrana celular (Revankar, 2005) y también en distintos compartimentos subcelulares, como el retículo endoplásmico, el núcleo, el citoplasma (Cheng et al., 2011) y la mitocondria (Ronda & Boland, 2016).

Se ha demostrado que el GPER media la activación de la subunidad  $G\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas, la cual resulta en la activación de adenilato ciclasa y la acumulación de cAMP, la activación transcripcional de CREB y efectos vasculares.

Otras vías activadas por la interacción de GPER con sus ligandos incluye la vía PI3K, PKC y movilización de calcio.



**Figura 11** Localización y roles fisiológicos en distintos sistemas del GPER. La evidencia actual indica que el GPER está involucrado en el sistema nervioso central, cardiovascular, músculo-esquelético, inmune, reproductivo, endocrino y renal. (Modificado de Prossnitz & Barton, 2014).

## **1.2 Justificación**

(-)-Epicatequina aumenta la función muscular asociada a un incremento en la biogénesis mitocondrial. No obstante, su mecanismo de acción es desconocido. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que (-)-epicatequina activa al GPER; receptor que se ha descrito en el músculo esquelético. Por lo tanto, evaluaremos la participación del GPER sobre los efectos mitocondriales inducidos por (-)-epicatequina en un modelo in vitro de músculo esquelético.

Los resultados de este estudio aportarán información novedosa y crucial sobre el mecanismo de acción de (-)-epicatequina y posiblemente posicionará al GPER como un candidato terapéutico para prevenir/tratar la sarcopenia ligada al envejecimiento.

## **1.3 Hipótesis**

Los efectos de la (-)-EPI sobre la biogénesis mitocondrial en C2C12 son mediados por el receptor GPER.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Demostrar que los efectos de la (-) – EPI sobre la biogénesis mitocondrial en células C2C12 son mediados por el GPER.

### **1.4.2 Objetivos particulares**

1. Evaluar los efectos de (-)-epicatequina sobre la biogénesis mitocondrial.
2. Analizar la participación del GPER en los efectos de (-)-epicatequina sobre la biogénesis mitocondrial.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Cultivo de la línea celular C2C12

La línea de músculo esquelético de ratón (mioblastos C2c12) fue obtenida de American type Culture Collection (ATCC). Las células se mantuvieron a 37° C en una incubadora con atmosfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> y cultivadas en medio DMEM F-12 suplementando con 10% de Suero fetal bovino (SFB) y 1% antibiótico antimicótico.

### 2.2 Diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos

Cuando se requería diferenciar los mioblastos a miotubos, las células estaban a un 80% de confluencia y el medio se cambiaba a DMEM F-12 suplementado con 2% Suero de caballo (HS) y 1% antibiótico antimicótico. El medio se cambiaba diariamente y el proceso de diferenciación fue monitoreado por microscopia de luz transmitida. El tiempo de diferenciación varía de 72 a 120 horas después del cambio de medio.

### 2.3 Inmunofluorescencia

Los mioblastos C2C12 se sembraron en placas de vidrio pre cubiertas con gelatina al 0.1%, se incubaron durante 24 horas en medio de crecimiento y se diferenciaron. Cuando estuvieron diferenciados los miotubos se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron con tritón al 0.1% en PBS, tres lavados de 5 minutos a temperatura ambiente.

Después las células se bloquearon con una solución de BSA al 3% y 0.3M de glicina en PBS durante 1 hora. Posteriormente las placas se incubaron con un anticuerpo policlonal contra el dominio N-terminal del GPER (1:100, 3% BSA en PBS) durante toda la noche a 4°C, seguido de 3 lavados con PBS. A continuación, se utilizó el anticuerpo secundario Anti- conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (1:400, en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS. Finalmente, las placas se secaron verticalmente durante 10 minutos y se sellaron con medio de montaje VECTASHIELD con DAPI. Las imágenes se tomaron

en un microscopio confocal invertido Olympus FV1000IX81 a una resolución de 1024x1024 píxeles en un objetivo de 60x.

## 2.4 Tratamiento de las células

Después de la diferenciación las células en medio DMEM/F-12 fueron tratadas con los distintos compuestos (-)-EPI, G-36, G-1 en diferentes concentraciones (de acuerdo a los requerimientos del experimento) durante 48 horas. Los compuestos G-1 y G-36 fueron disueltos en 50:50 agua destilada/DMSO. Y (-)-EPI fue disuelta en agua destilada solamente. El DMSO se agregó en volúmenes iguales a todos los grupos.

G-36 (0.1-1 $\mu$ M, 15 minutos de pre incubación)

(-)-EPI (3-10  $\mu$ M, 48 horas de incubación)

G-1 (0.1-1  $\mu$ M, 48 horas de incubación).

El antagonista G-36 se utilizó para el bloqueo parcial de los ligandos. G-36 y G-1 se disolvieron en DMSO y (-)-EPI en agua. Todas las placas contenían la misma cantidad de DMSO (<0.5%). Los medios y compuestos se reemplazaron cada 24 horas.

## 2.5 Viabilidad celular

Para saber si (-)-EPI tenía algún efecto sobre la viabilidad celular en los miotubos C2C12, se realizó un ensayo de viabilidad celular con distintas concentraciones de los compuestos antes mencionados. Se sembraron 1000 células en placas de 96 pozos pre-cubiertas con gelatina al 0.1%, las células se cultivaron durante 24 horas y se diferenciaron. Después de 48 horas de tratamiento el medio se aspiró de las placas y se lavaron 1 vez con 100  $\mu$ l de Solución balanceada de Hanss (HBSS) y después se incubaron con 100  $\mu$ l de 0.5mg/ml MTT en HBSS, durante 1 hora a 37°C, posteriormente se eliminó la solución de MTT y se adicionaron 100  $\mu$ l de DMSO por pozo, para disolver los cristales de formazán. Las placas se incubaron a

37°C durante 15 minutos. Posteriormente se midió el cambio colorimétrico de cada pozo mediante absorbancia a 570nm utilizando un espectrofotómetro Epoch para microplacas.

## **2.6 Morfología celular**

Se evaluaron cambios morfológicos en los miotubos C2C12, después de las 48 horas de tratamiento mediante microscopia (EVOSTM XL Cell Imaging System). Los miotubos se identificaron como células alargadas con más de dos núcleos definidos. Las imágenes se tomaron en el microscopio a 10x, 20x y 40x. Por cada imagen se analizaron al menos 10 mediciones de miotubos representativos. Se midió el largo y el ancho de cada miotubo utilizando el software Image J. El largo y ancho se calcularon trazando líneas (ajustadas a la escala de cada imagen) a lo largo y ancho de cada miotubo.

## **2.7 Análisis de la biogénesis mitocondrial**

Para evaluar los efectos de (-)-EPI sobre la BiM, se empleó el Kit MitoBiogenesis™ In-Cell ELISA (MitoSciences Inc., Eugene, OR, USA), con las indicaciones del fabricante. El kit permite la detección simultánea de la subunidad de la succinato deshidrogenasa o complejo mitocondrial II (SDH-A) la cual está codificada en el DNA nuclear, y de la subunidad de la citocromo C oxidasa o complejo mitocondrial IV (COX-I) la cual está codificada en el DNA mitocondrial. De tal forma que un incremento en el cociente COX-I SDH-A indica estimulación de la BiM.

Se sembraron mioblastos C2C12 (10,000 células por pozo) en una placa de 96 pozos pre-cubierta con gelatina al 0.1% y se dejaron crecer hasta que tuvieran un 70% de confluencia. Posteriormente las células se diferenciaron de 3-5 días hasta que se observara un porcentaje de diferenciación mayor al 70%.

Las células se trataron durante 48 horas con los compuestos. Después se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos. Después de la fijación, las células se permeabilizaron, se bloquearon y se incubaron con un anticuerpo primario, de acuerdo a las instrucciones del kit. Los niveles de proteína de SDH-A y COX-I se midieron mediante el espectrofotómetro a 405 nm y 600 nm respectivamente. Posteriormente se tiñeron los núcleos con el colorante DAPI durante

30 minutos a temperatura ambiente para normalizar el número de células de cada placa. Se tomaron imágenes con el microscopio EVOS® FLoid® Cell Imaging Station. Después las imágenes se analizaron con el software Image J para establecer la densidad celular contando el número de núcleos por pozo. Finalmente se calcularon los cocientes COX-I/DAPI, SDH-A/DAPI y COX-I/SDH-A/DAPI.

## 2.8 Determinación de la densidad mitocondrial

La masa mitocondrial se evaluó mediante la tinción de MitoTracker Green FM por microscopía de fluorescencia en el microscopio EVOS® FLoid® Cell Imaging Station en miotubos C2C12. Los mioblastos se sembraron en placas de 12 pozos pre-cubiertas con gelatina al 0.1%, 20 000 células por pozo y se crecieron hasta que alcanzaran el 70% de confluencia. Los mioblastos se diferenciaron a miotubos. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se tiñeron con MitoTracker Green FM durante 30 minutos a 37 ° C. Las células se lavaron con PBS y se tomaron fotografías en el microscopio. Posteriormente se analizaron las imágenes al azar y se calculó la fluorescencia total corregida (CTCF) con el programa Image J, utilizando la siguiente fórmula:

$CTCF = \text{Densidad Integrada} - (\text{Área de la célula} \times \text{media de la fluorescencia de fondo})$ . Se analizaron al menos 15 miotubos por campo.

## 2.9 Extracción de proteínas

Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 300, 000 células por pozo hasta alcanzar el 70% de confluencia. Las células se diferenciaron y se dieron 48 horas de tratamiento.

Se retiró el medio, se lavó tres veces con HBSS y se lavaron con 200  $\mu$ L de buffer frío (140 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/L NaF en 218 50 mmol/L Tris-HCl) suplementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas 1 $\mu$ l de inhibidor por 1 mL de Buffer. Las células se despegaron con un gendarme, y se almacenaron en tubos cónicos de 1.5mL (Eppendorf). Los homogenados se sonicaron durante 10 minutos a 4° C y se centrifugaron (14000 rpm) durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se descartó la pastilla (restos celulares).

La proteína total se midió mediante el ensayo de Bradford.

## **2.10 Western blot**

Las células se trataron durante 48 horas y las proteínas fueron extraídas como se mencionó anteriormente. Se cargaron 30 µg de proteína con buffer de carga en geles 4-15% Bis-Tris Plus de 10 pozos, se realizó la electroforesis de proteínas (100 Volts durante 1 hora), se realizó la electrotransferencia a membranas P-Immobilon, durante 1 hora a 20 Volts y amperaje constante.

Posteriormente las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche (Svelty® 0% grasa) al 5% en TBST. Después se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a 4° C durante toda la noche. Se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP diluido en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron nuevamente 3 veces por 5 minutos en TBST. Los inmunoblots se revelaron con una solución 1:1 del kit de detección ECL, en un fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS+System, BIO-RAD), el tiempo de exposición varió de acuerdo a la proteína. La intensidad de las bandas se cuantificó digitalmente en el programa ImageJ y las proteínas se normalizaron contra los niveles de GAPDH (cuya expresión permanece constante).

Los anticuerpos primarios se utilizaron en dilución 1:1 000 o 1: 2000 En TBST con 5% de leche sin grasa o % Albúmina de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos secundarios se utilizaron en una dilución 1: 5000 en TBST con 5% de leche sin grasa o albúmina.

## **2.11 Ensayo de la enzima citrato sintasa**

Se utilizaron 10 µg de proteína para realizar el ensayo en una placa de 96 pozos. El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones del kit (ScienceCell-Research Laboratories). Las soluciones se utilizaron a temperatura ambiente, de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Preparación de las muestras para ensayo de la enzima citrato-sintasa

<b>Solución</b>	<b>Volumen</b>
Buffer de ensayo	175 $\mu$ L
Acetil Co-A	10 $\mu$ L
DTNB (1X)	3 $\mu$ L
Triton X-100	2 $\mu$ L
Proteína total 10 $\mu$ g	Volumen variable

Posteriormente se añadieron 10  $\mu$ L de oxalacetato y se homogeneizaron los pozos. Inmediatamente después se realizó a lectura a 412 nm en un espectrofotómetro Epoch para microplacas en un programa cinético por 2 minutos con intervalos de 10 segundos.

## 2.12 Análisis de la abundancia mitocondrial

La masa mitocondrial se evaluó mediante la tinción de MitoTracker Red FM por microscopia de fluorescencia en el microscopio EVOS® FLoid® Cell Imaging Station en miotubos C2C12. Los mioblastos se sembraron en placas de 12 pozos pre-cubiertas con gelatina al 0.1%, 20 000 células por pozo y se crecieron hasta que alcanzaran el 70% de confluencia. Los mioblastos se diferenciaron a miotubos. Posteriormente las células se trataron con (-)-EPI ó G-36 o con siRNA-GPER.

Posteriormente las células se lavaron con PBS y se tiñeron con MitoTracker Red FM durante 30 minutos a 37 ° C. Las células se lavaron con PBS y se tomaron fotografías en el microscopio. Posteriormente se analizaron las imágenes (al azar). Se calculó la fluorescencia total corregida (CTCF) con el programa Image J, utilizando la siguiente formula:

CTCF= Densidad Integrada-(Área de la célula X media de la fluorescencia de fondo). Se analizaron al menos 15 miotubos por campo.

## 2.13 Inhibición del GPER mediante siRNA

Los miotubos C2C12 se usaron en una confluencia del 80% en placas de 12 pozos. Las células se incubaron con medio DMEM F-12 y el día de tratamiento con siRNA el medio se cambió por OPTIMEM, 500  $\mu$ l por pozo. Las células se trataron con Endoportier 6 $\mu$ M, endoportier 6 $\mu$ M+siRNA 0.1 $\mu$ M control, endoportier 6 $\mu$ M+siRNA GPER 0.1 $\mu$ M. El endoportier con siRNA (control o GPER) fue preincubado en un tubo cónico de 1.5 $\mu$ L (eppendorf) durante 15 minutos.

Después de 6 horas el medio OPTIMEM fue remplazado por medio DMEMF12. Las células fueron recolectadas y se extrajo la proteína como se mencionó anteriormente para analizar la cantidad de GPER mediante Western blot a 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se observó que 48 horas es el tiempo óptimo para observar la disminución de los niveles de GPER después del tratamiento con siRNA.

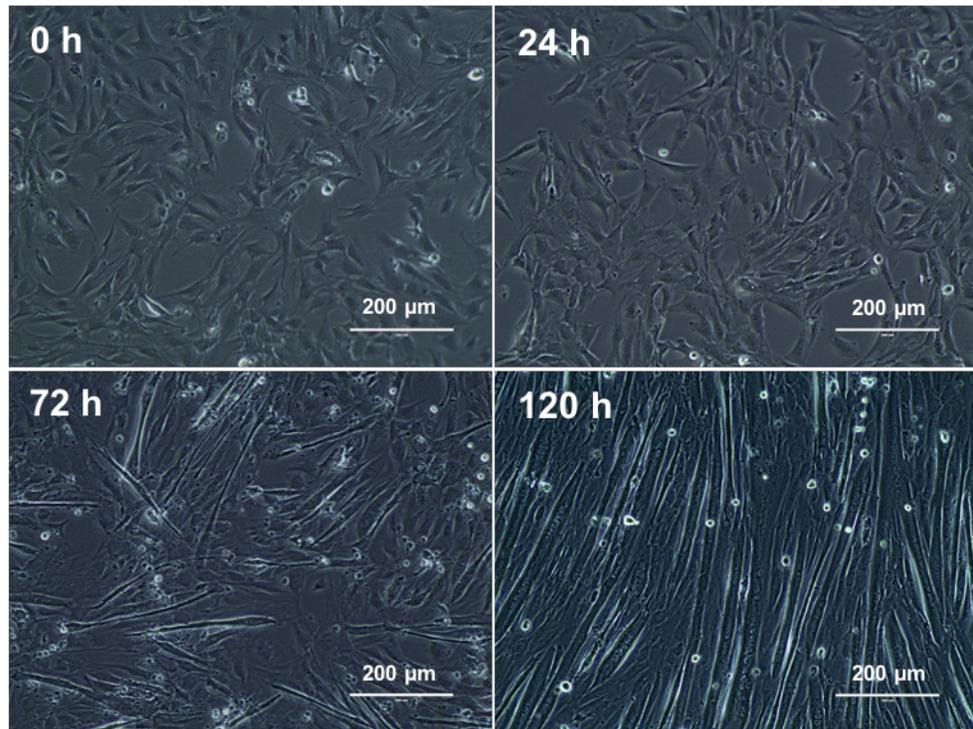
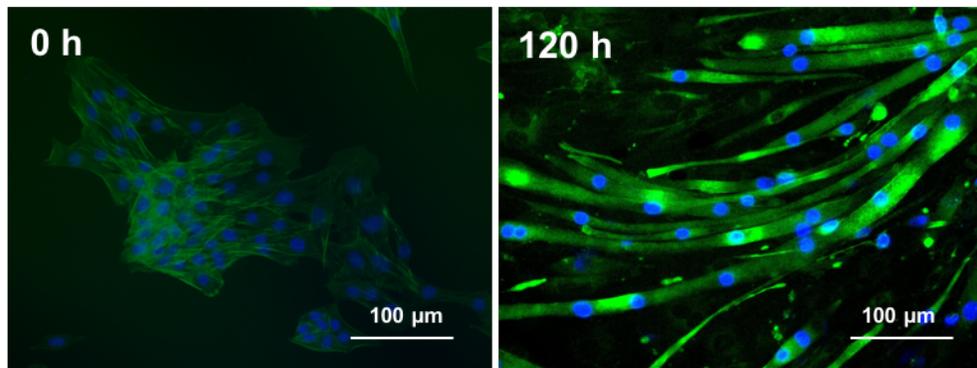
Se realizó el mismo tratamiento con siRNA y 48 horas después las células fueron tratadas con los compuestos (G-1 0.1 $\mu$ M, (-)-EPI 10 $\mu$ M) durante 48 horas. Finalmente, las células fueron tratadas con MitoTracker Red FM como se describió previamente. Se tomaron imágenes en el microscopio de fluorescencia y se analizaron mediante el programa Image J.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Proceso de diferenciación mioblastos a miotubos en células C2C12

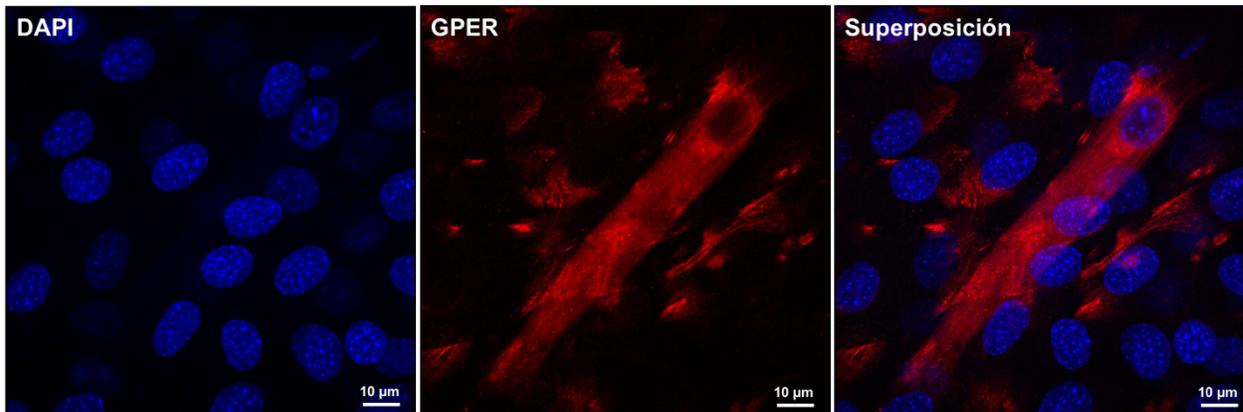
Se indujo la diferenciación de los mioblastos, como se mencionó previamente en la sección de materiales y métodos. La diferenciación celular fue monitoreada diariamente en el microscopio de transmisión de luz para evaluar cambios en la morfología; los mioblastos se diferenciaron a células alargadas, con más de dos núcleos por miotubo. En función del tiempo aumentó el número de miotubos observados, siendo las 72 horas el tiempo en el que la diferencia en la morfología celular es evidente. En este trabajo los mioblastos se diferenciaron hasta por un período de 120 horas, por lo cual obtuvimos un porcentaje de diferenciación de aproximadamente el 80%. Los tratamientos se aplicaron cuando las células alcanzaron un porcentaje de diferenciación mayor al 70%. En la figura 12 y 12 B se observan imágenes representativas del proceso de diferenciación a través del tiempo (24, 72 y 120 horas).

**A****B**

**Figura 12.** Proceso de diferenciación con respecto al tiempo de mioblastos a miotubos C2C12. (A) Imágenes representativas del proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos a las 24, 72 y 120 horas posteriores a la incubación en medio DMEM con 2% Suero de Caballo (medio de diferenciación). Las imágenes fueron obtenidas por microscopia de luz en un objetivo 20x. Barra de escala= 200µM. (B) Imágenes representativas de mioblastos no diferenciados y miotubos 120 horas después de la diferenciación, mediante microscopia de fluorescencia, en verde tinción de actina para el citoesqueleto y en azul tinción con DAPI para núcleos. Barra de escala 100 µM.

### 3.2 Evaluación de la presencia del GPER en miotubos C2C12

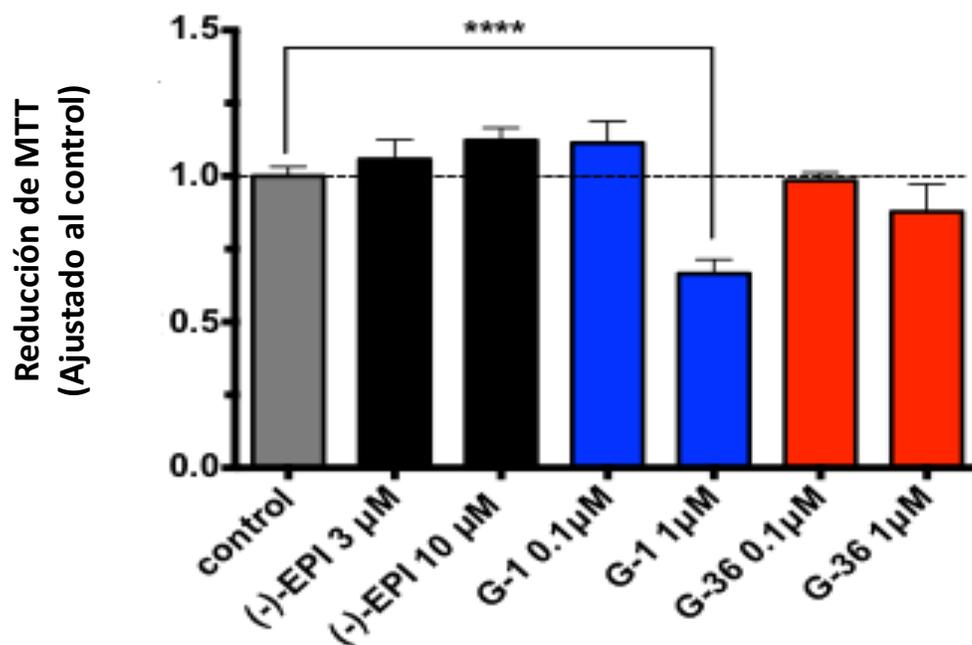
Una vez que se evaluó el proceso de diferenciación de la línea celular, se procedió a identificar la presencia del GPER en miotubos C2C12. En la figura 13 observamos la presencia del GPER dentro y fuera de las células. Además, se utilizó un control negativo de células incubadas sólo con anticuerpo secundario para descartar uniones inespecíficas.



**Figura 13. Localización del GPER en miotubos C2C12.** Imágenes representativas de microscopia confocal de miotubos C2C12 permeabilizados. Se utilizó un anticuerpo policlonal contra el dominio N-terminal del GPER y un anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con Alexa Fluor 594 (tinción en rojo). El colorante DAPI se utilizó para la tinción de núcleos (azul). Las imágenes se obtuvieron con un Microscopio Confocal invertido Olympus FV1000 IX81. A una resolución de 1024x1024 píxeles en un objetivo de 60x.

### 3.3 Análisis de los efectos de los ligandos sobre la viabilidad celular

Las células fueron tratadas como se menciona en material y métodos para evaluar los efectos de los ligandos sobre la viabilidad celular. En la figura 14 se puede observar que el tratamiento a una concentración 1  $\mu\text{M}$  de G-1, muestra un efecto negativo sobre la viabilidad de los miotubos; aunque no hay cambios significativos con el tratamiento de G-36 se observa una tendencia en la reducción de la viabilidad celular en la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, no se observan cambios significativos en los miotubos tratados con las concentraciones de (-)-EPI. Por lo tanto, los experimentos posteriores se realizaron con la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  para G1 y G-36 (Figura 14).

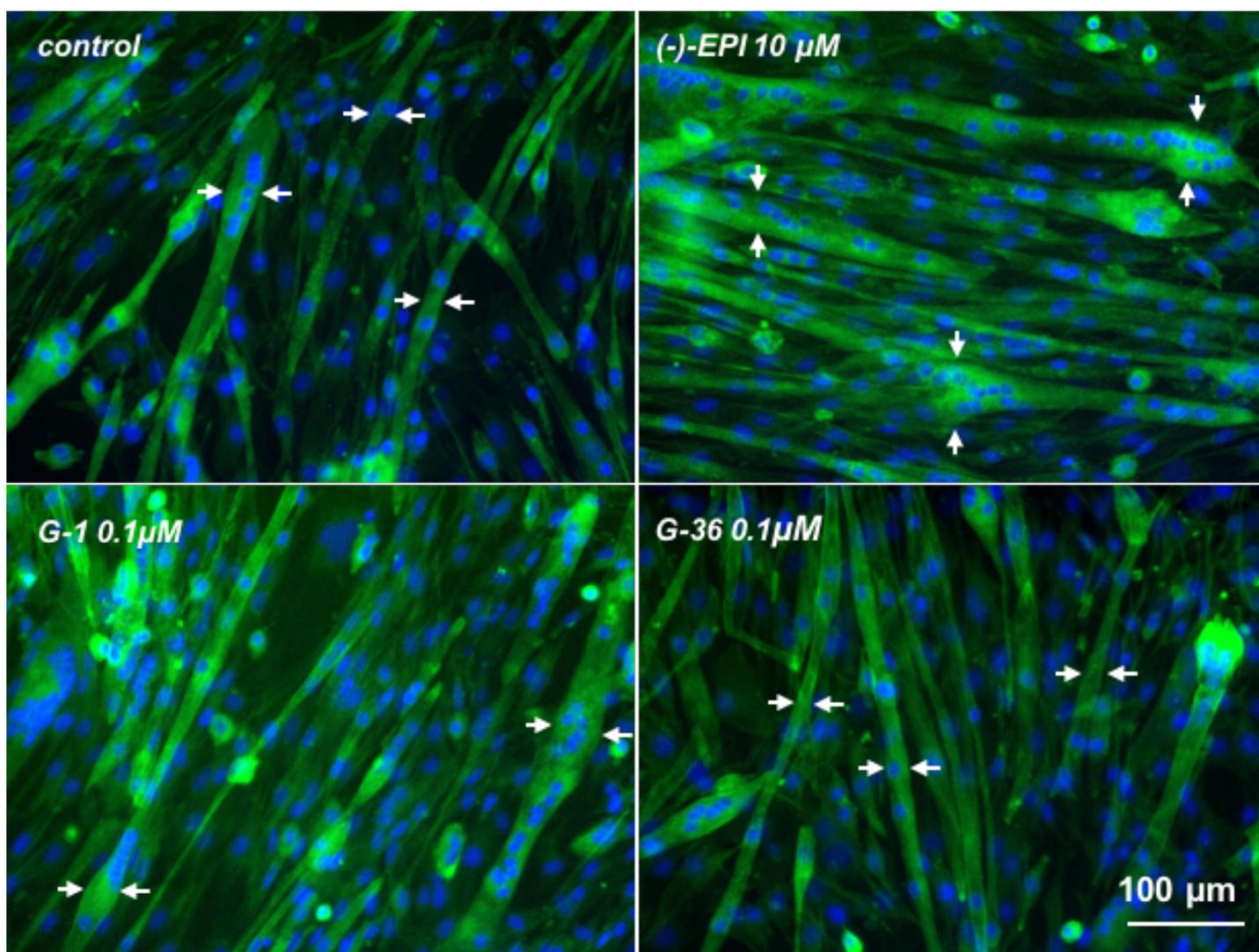


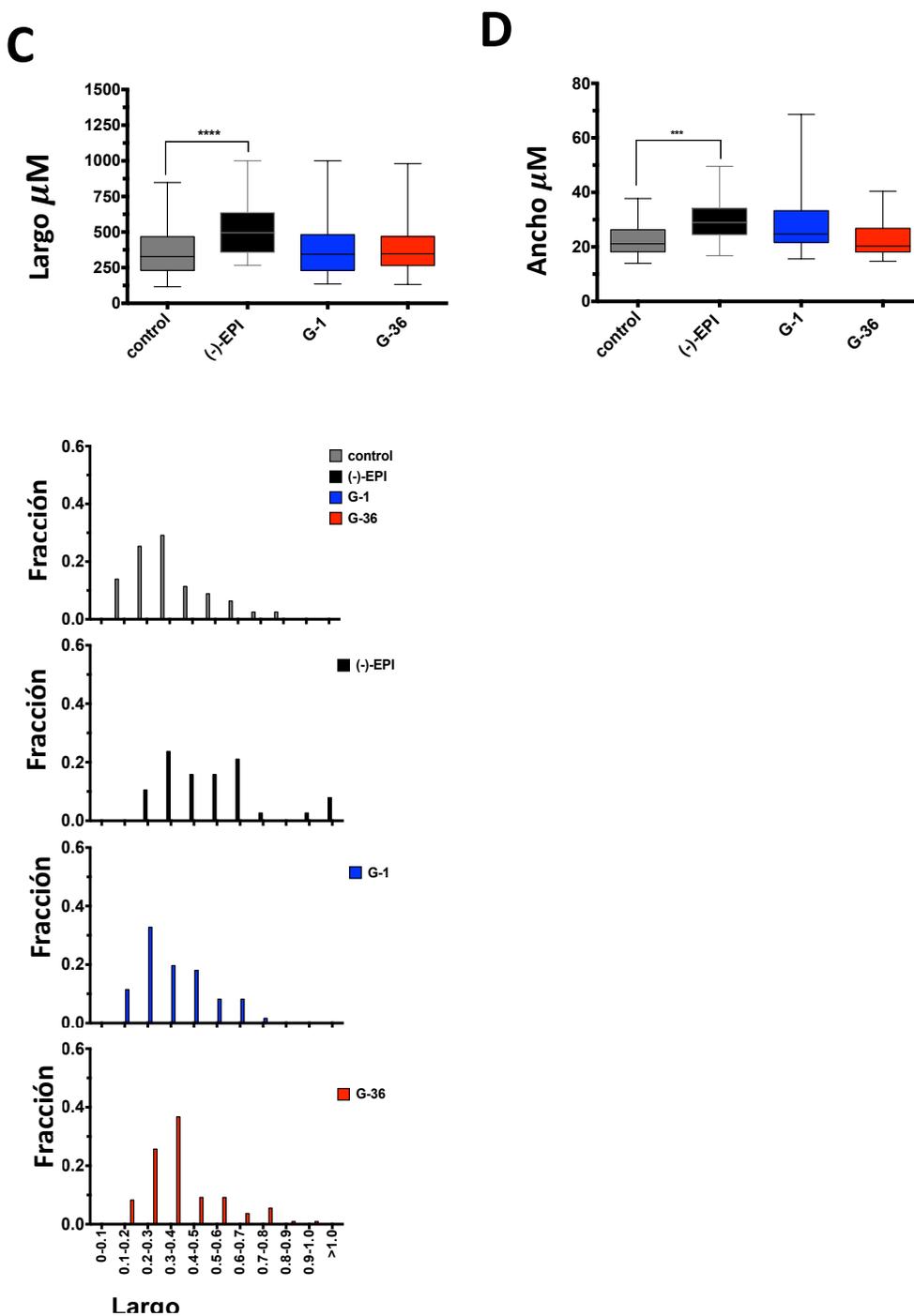
**Figura 14.** Efecto de los ligandos sobre la viabilidad de miotubos C2C12. Los mioblastos se trataron con los ligandos en diferentes concentraciones durante 48 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante la reducción del MTT. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes por cuatuplicado. \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  comparado con el control y analizado por ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet.

### 3.4 Análisis de los efectos de los ligandos sobre la morfología celular

Evaluamos los efectos de los ligandos sobre la morfología celular (largo y ancho) de los microtubulos, después de 48 horas de tratamiento. En la figura 15.A se observan imágenes de fluorescencia representativas donde se indica con flechas blancas el ancho de los microtubulos. En la figura 15 C y D observamos la cuantificación del promedio del largo y ancho de los microtubulos tratados con los ligandos. Se observa que el tratamiento con (-)-EPI incrementa el largo y ancho de los microtubulos comparado con el grupo control o el grupo tratado con G-1. Por otro lado, G-36 no afecta la morfología de los microtubulos cuando lo comparamos con el grupo control.

# A





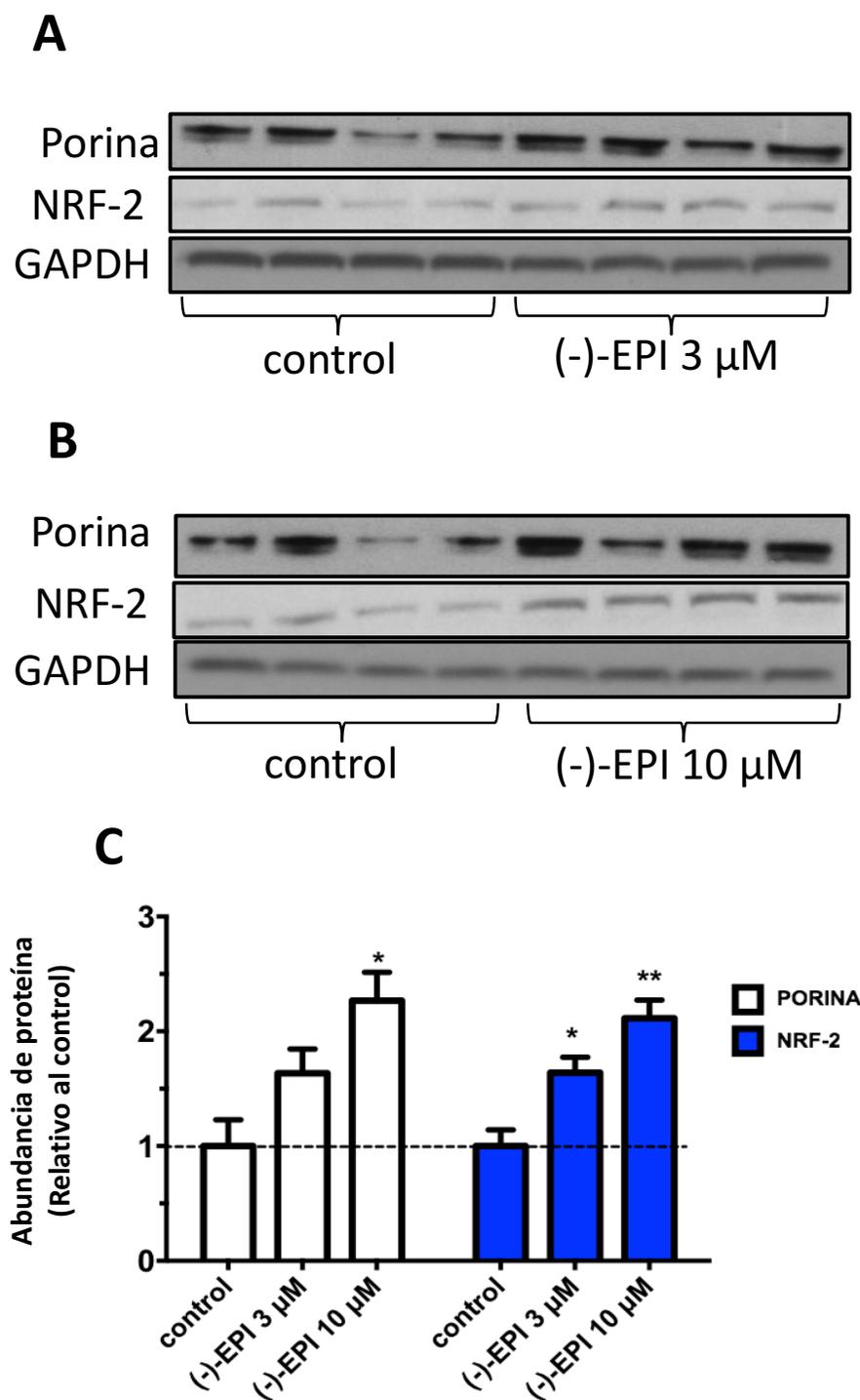
**Figura 15.** Efectos de los ligandos sobre la morfología celular en miotubos C2C12. Imágenes representativas de los cambios en la morfología celular de los miotubos tratados con los distintos ligandos. Se utilizó microscopía de fluorescencia. En verde una tinción de actina para el citoesqueleto y en azul tinción de DAPI para los núcleos. Las líneas blancas muestran el ancho de miotubos representativos. (B) Histograma del largo (mm) de los miotubos en células tratadas con los distintos ligandos. (C y D). Cuantificación del largo y ancho de los miotubos ( $\mu\text{M}$ ). Los datos se expresan como la mediana y el rango intercuartil de al menos tres experimentos independientes. \*\*\* $p \leq 0.001$  vs. Control analizado por una prueba Kruskal-Wallis seguido por una prueba de Dunn para múltiples comparaciones.

### 3.5 Concentración respuesta de (-)-EPI sobre marcadores de BiM

Con el fin de evaluar los efectos de (-)-EPI en la BiM, examinamos distintos marcadores. Se encontró un aumento significativo dependiente de la concentración en los niveles de porina y NRF-2, es decir con la concentración de 10  $\mu$ M hubo un aumento en la expresión comparado con la concentración 3  $\mu$ M (Figura 16).

Por otro lado, analizamos la actividad de la citrato sintasa la cual aumentó comparado con el grupo control (0.52 $\pm$ 0.01 vs. 0.41 $\pm$ 0.01 unidades/mg proteína, \*\*p  $\leq$ 0.01) figura 17.

Derivado de estos resultados la concentración de (-)-EPI utilizada para los siguientes ensayos fue la de 10  $\mu$ M.



**Figura 16 .** Concentración respuesta de (-)-EPI sobre proteínas indicadoras de BiM. Inmunoblots representativos de las proteínas porina y NRF-2 después del tratamiento con los ligandos a las 48 horas. (A) (-)-EPI 3  $\mu$ M durante 48 horas de tratamiento. (B) (-)-EPI 10  $\mu$ M durante 48 horas de tratamiento. GAPDH se utilizó como control de carga. (C) Cuantificación de la abundancia de porina y NRF-2 por análisis densitométrico. Los datos se normalizaron con los valores medio del grupo control y se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control  $**p \leq 0.01$  comparado con el grupo control. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey .

### 3.6 Efectos inhibitorios de G-36 en la BiM inducida por (-)-EPI

Realizamos experimentos con el antagonista selectivo del GPER, G-36, con el fin de observar cambios en los marcadores de BiM como la expresión de p70S6, NRF-2 y Tfam, así como la actividad de la citrato sintasa y un ensayo de ELISA para medir biogénesis mitocondrial.

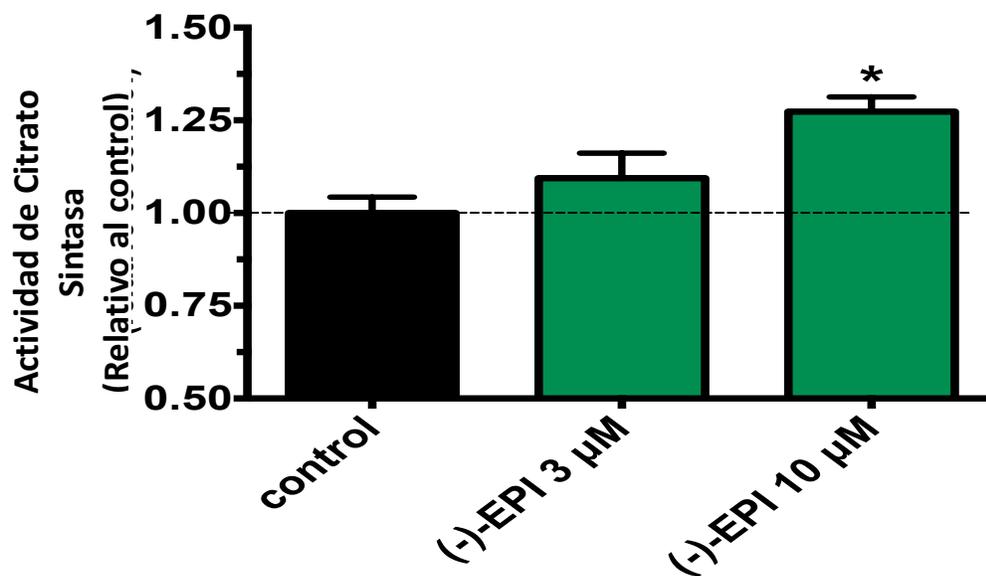
Los niveles de p70S6 incrementaron a la concentración 10  $\mu$ M de (-)-EPI, este efecto se inhibió cuando las células fueron tratadas con G-36 como se observa en la imagen 18. G-1 no tuvo efecto en los niveles de p70S6. También analizamos los efectos de G-36 sobre el incremento de NRF-2 y TFAM inducido por (-)-EPI. Como se muestra en la figura 18 (-)-EPI atenúa los efectos de (-)-EPI sobre el incremento de NRF-2 y TFAM.

Así mismo el aumento en la actividad de la enzima citrato sintasa disminuyó cuando tratamos las células con (-)-EPI +G-36 (Figura 19).

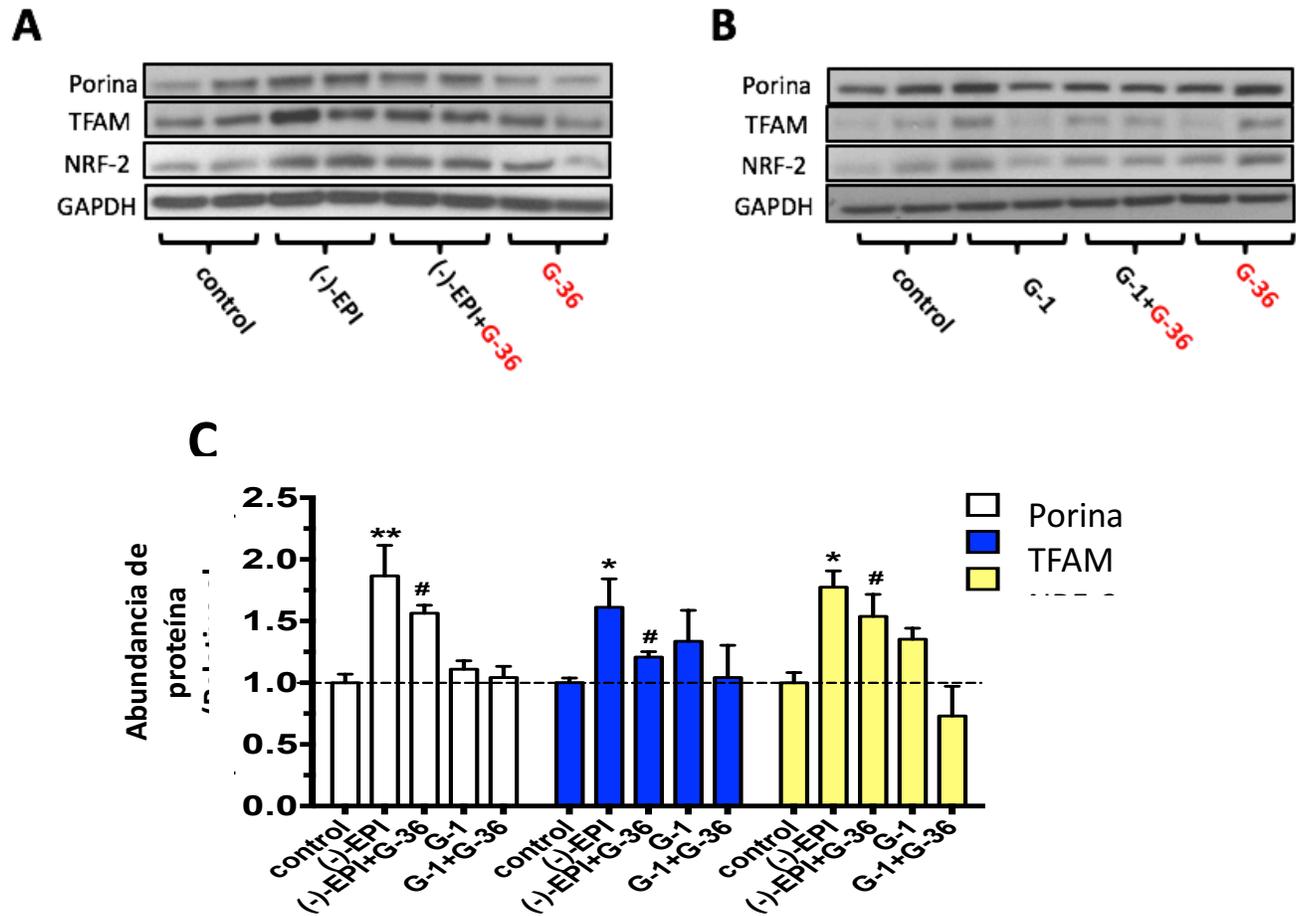
De tal forma que a las concentraciones evaluadas (-)-EPI posee mayor eficacia que G-1 sobre el incremento de los parámetros de BiM evaluados.

También se realizó una prueba de ELISA que permite evaluar cambios simultáneos en dos subunidades de la cadena respiratoria. Se utilizó el kit mito-biogénesis ELISA el cual mide dos proteínas mitocondriales, la subunidad I del complejo IV (COX-I), codificada en el DNA mitocondrial y la subunidad de 70kDa del complejo II (SDH-A), la cual se codifica en el núcleo. La expresión de SDH-A permanece constante, mientras que la expresión de COX-I puede variar (Figura 20). Un incremento en el ratio COX-I/SDH-A sugiere un aumento en la BiM. Se utilizó la tinción de DAPI para núcleos como control negativo a fin de discernir entre un aumento en la síntesis de proteínas de la proliferación celular (Figura 20).

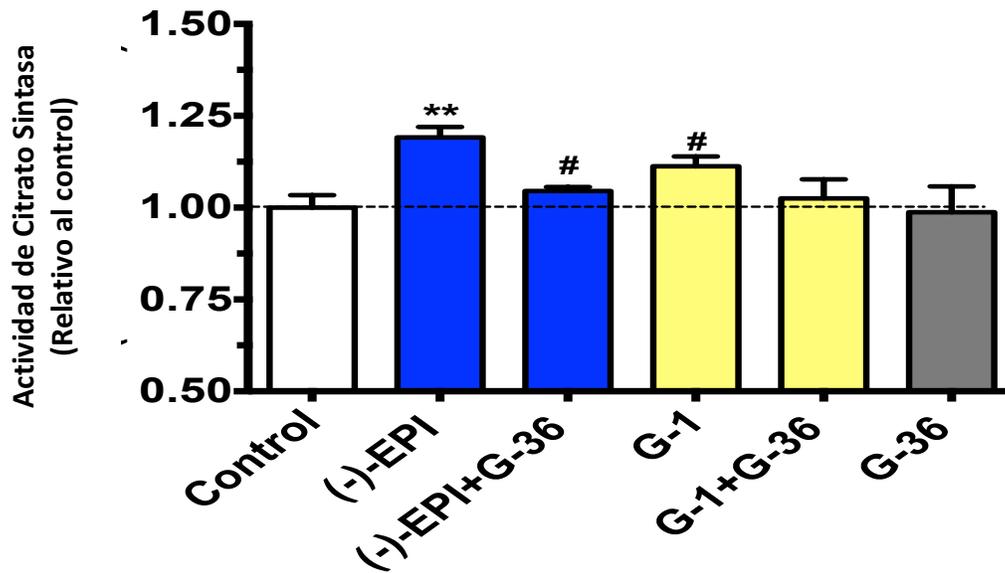
Se observó que (-)-EPI aumentó los niveles de COX-I e un 20% con respecto al control  $**p \leq 0.001$ , y no hubo cambio en la expresión de SDH-A comparado con el control. Este efecto fue bloqueado por G-36. El ratio COX-I/SDH-A fue normalizado contra el número total de células y el resultado fue significativamente mayor comparado con el grupo control lo cual indica estimulación de la BiM inducida por (-)-EPI.



**Figura 17** . Concentración respuesta de (-)-EPI sobre la actividad de la citrato sintasa. La actividad de la enzima citrato sintasa fue cuantificada mediante el sobrenadante de los lisados celulares tratados con los distintos ligandos 3 o 10  $\mu\text{M}$  de (-)-EPI y los valores se normalizaron con el contenido de proteína. Los datos se normalizaron con el grupo control y se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes \* $p \leq 0.05$  analizado por ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey.

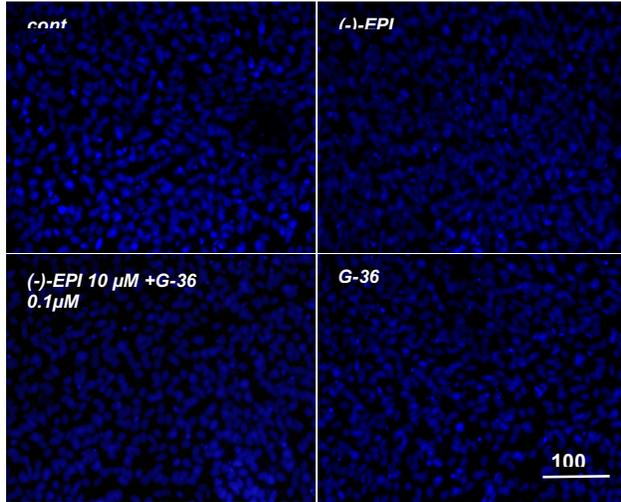


**Figura 18.** Análisis del efecto inhibitorio de G-36 en los efectos de BiM inducida por (-)-EPI. Inmunoblots representativos de la abundancia de proteína de TFAM y NRF-2 después del tratamiento con (-)-EPI 10  $\mu$ M (A) o G-1 0.1  $\mu$ M (B) con o sin G-36 durante 48 horas. (C) Cuantificación de los niveles de TFAM y NRF-2 por análisis densitométrico. Los datos se normalizaron con el grupo control y se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes por cuatriplicado \* $p \leq 0.05$ , # $p > 0.05$  comparado con el grupo control y se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

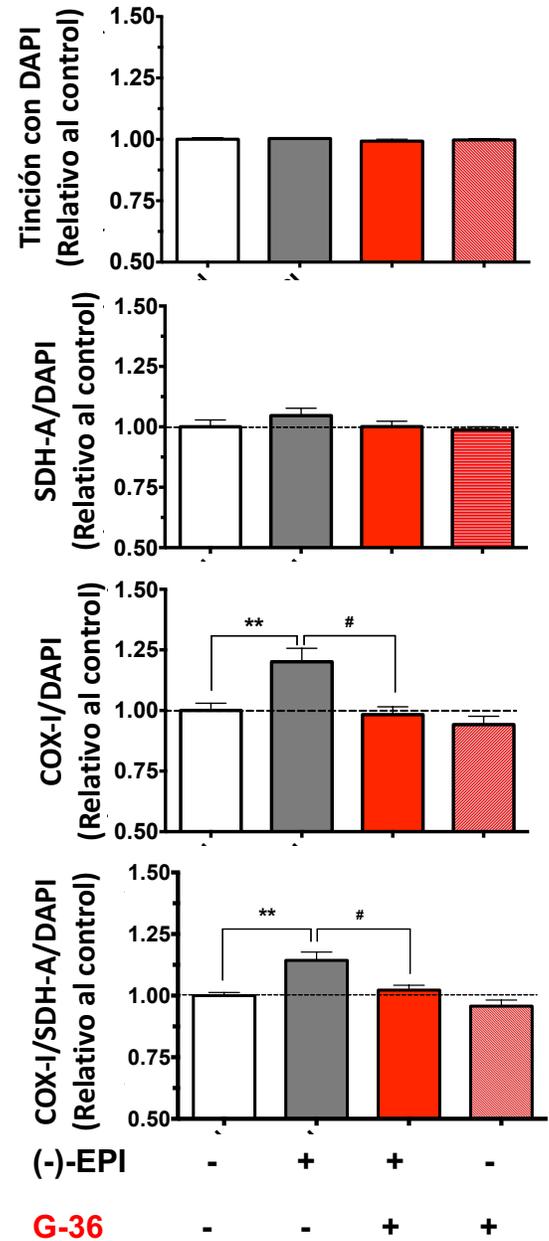


**Figura 19.** Análisis del efecto inhibitorio de G-36 en los efectos de BiM inducida por (-)-EPI sobre la actividad de la enzima citrato sintasa. La actividad de la enzima citrato sintasa fue cuantificada mediante el sobrenadante de los lisados celulares tratados con (-)- EPI 10  $\mu\text{M}$  o G-1 0.1  $\mu\text{M}$  con o sin G-36 0.1  $\mu\text{M}$  los valores se normalizaron al contenido de proteína. Los datos se normalizaron con el grupo control y se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes \* $p \leq 0.05$ , # $p > 0.05$  comparado con el grupo control y se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

**A**



**B**



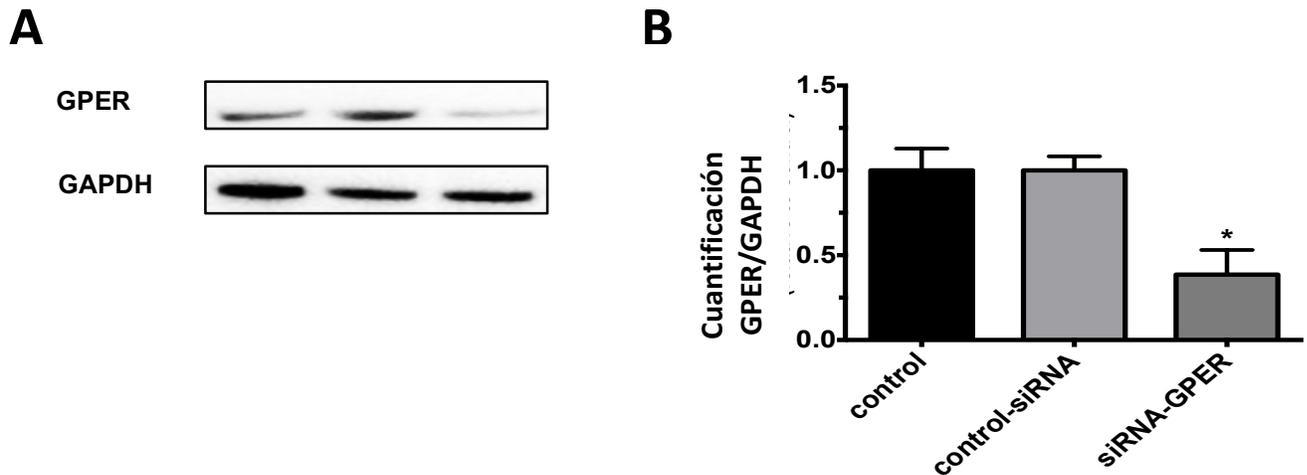
**Figura 20.** Análisis de los efectos de (-)-EPI sobre la BIM en miotubos. Los miotubos fueron tratados con (-)-EPI 10  $\mu$ M con o sin G-36 0.1  $\mu$ M durante 48 horas. (A) Medición de la BiM mediante el kit e ELISA para detectar niveles simultáneos de proteína. SDH-A y COX-I. El cociente SDH-A/COX-I refleja la activación o inhibición de la BiM. (B) Los núcleos se tiñeron con DAPI como control de la densidad celular. Los cocientes SDH-A/DAPI, COX-I/DAPI, COX-I/SDH-A/DAPI se calcularon. Los datos se normalizaron con el grupo control y se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \*\* $p \leq 0.01$ , #  $p > 0.05$  comparado con el grupo control y se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

### 3.7 Efectos inhibitorios de siRNA-GPER sobre la biogénesis mitocondrial inducida por siRNA

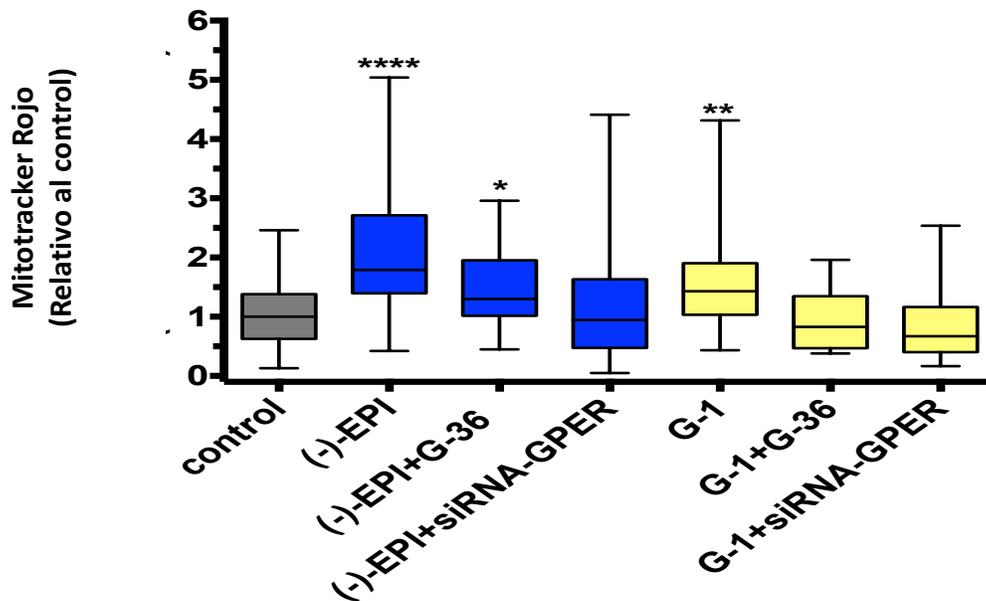
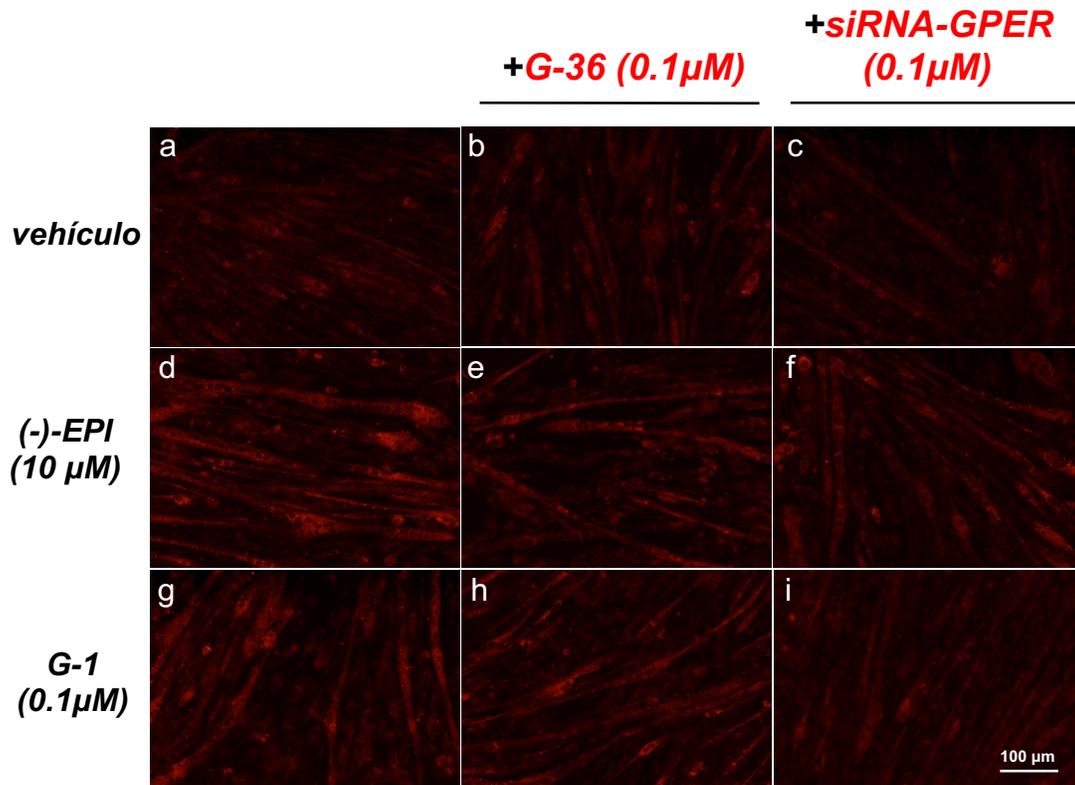
Realizamos experimentos con siRNA-GPER con el fin de inhibir la expresión del GPER en miotubos y observar cambios en los marcadores de la BiM mediante MitoTracker Red.

Realizamos ensayos de la inhibición del GPER a distintas horas posteriores a la transfección y concluimos que 48 horas después de la transfección era el tiempo óptimo para inhibir los niveles de GPER, como se observa en el análisis de proteína por Western blot (Figura 21).

En la figura 22 A se observa el cambio en el aumento de la fluorescencia de los miotubos tratados con (-)-EPI cuando son transfectados con siRNA-GPER. Observamos que la intensidad de la fluorescencia disminuye en los mioblastos transfectados con siRNA-GPER, así como con la incubación con el antagonista G-36.



**Figura 21.** Comprobación de la transfección del GPER (siRNA). (A) Western Blot representativo de la inhibición del GPER después de la transfección con siRNA durante 48 horas, se muestra el grupo control, el control-siRNA y el grupo siRNA-GPER. (B) Cuantificación de los niveles de proteína de GPER después de las 48 horas de la transfección. Los datos se normalizaron con el grupo control y se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes \*  $p < 0.05$  y se analizaron por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.



**Figura 22.** Análisis de Mitotracker Red en miotubos C2C12 tratados con siRNA-GPER. (A) En la imagen se muestra la fluorescencia del Mitotracker en grupos tratados con (-)-EPI o G-1 con G-36 o siRNA\_GPER. (B) Cuantificación de la fluorescencia de los miotubos tratados e inhibidos por G-36 o siRNA-GPER. Los niveles de fluorescencia en los miotubos se obtuvieron mediante el análisis de la Fluorescencia total por célula corregida. Utilizando el software Imge J. Usando la siguiente ecuación: CTCF=Densidad integrada-Área de la célula promedio de la fluorescencia de fondo) Como inhibidores del GPER se utilizó su antagonista químico G-36 o siRNA-GPER. Los datos se expresan como la mediana y el rango intercuartil de al menos tres experimentos independientes. \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  y \*\* $p \leq 0.01$ , comparado con el grupo control.

## Capítulo 4. Discusión

---

En este trabajo se estudió la participación del GPER en los efectos del flavanol natural (-)-EPI sobre la biogénesis mitocondrial de miotubos como un modelo *in vitro* de ME. Esto es importante en el contexto de la salud, ya que actualmente existe un gran interés en encontrar compuestos que puedan prevenir o tratar los efectos deletéreos relacionados a la sarcopenia. Pese a que es una condición inherente al envejecimiento, puede volverse un problema clínico evidente afectando la calidad de vida del individuo que la padece. Idealmente estos tratamientos tratan de brindar a los adultos una mayor independencia física para realizar labores cotidianas. En años recientes la búsqueda de tratamientos se ha centrado en compuestos naturales con baja o nula toxicidad, como los fitoquímicos, como los polifenoles.

Existe evidencia que sugiere que dichos compuestos poseen efectos benéficos sobre la salud a través de la activación de ciertas vías de señalización celular involucradas en la mejora de la función muscular. Entre estos efectos se encuentra la estimulación de la capacidad y crecimiento muscular, así como en la disminución de la degradación del músculo (Fraga & Oteiza, 2011). Sin embargo, algunos de los compuestos que presentan efectos positivos *in vitro* o *in vivo* sobre la función muscular no emulan dichos efectos cuando son evaluados en la fase clínica o presentan toxicidad a altas concentraciones. Dentro de este grupo de compuestos encontramos al resveratrol y el galato de epigallocatequina (principal componente del té verde) (Fraga & Oteiza, 2011; Tomé-carneiro et al., 2013).

Por otro lado, existe otro polifenol que ha demostrado tener efectos benéficos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* y que no es tóxico. La (-)-EPI es un flavanol de la familia de los flavonoides que se encuentra en distintos alimentos. Los efectos benéficos de la (-)-EPI se han descrito en diversos estudios *in vitro* (Gabriela Gutierrez-Salmeana, Theodore P. et al; 2014; Moreno-ulloa et al., 2013), *in vivo* (Maik Hüttemann, Icksoo Lee, 2012; Moreno-Ulloa, Nogueira, et al., 2015; Nogueira et al., 2011) y en humanos (Israel Ramirez-Sanchez, et al., 2013; Schroeter et al., 2006; Shay et al., 2015). Más específicamente, se ha visto que promueve la biogénesis mitocondrial. En el 2011, Nogueira y colaboradores reportaron los efectos de (-)-EPI en músculo de ratón, se observó un aumento en la abundancia de las crestas de la membrana interna mitocondrial, así como el aumento de la expresión proteica de los complejos respiratorios mitocondriales, y una mejor resistencia a la fatiga. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales (-)-EPI induce estos efectos no están del todo claros.

En 2015, Moreno-Ulloa y colaboradores demostraron que los efectos de (-)-EPI sobre la producción de óxido nítrico en células endoteliales eran mediados por el GPER (Moreno-Ulloa, Mendez-Luna, et al.,

2015). Se sabe que la producción de NO promueve la biogénesis mitocondrial mediante la activación de la guanilato ciclasa y la producción de GMP cíclico, que a su vez induce la transcripción de PGC-1 $\alpha$  y, consecuentemente, la biogénesis mitocondrial (Nisoli & Carruba, 2006). El GPER es un receptor del grupo de los GPCR y en el año 2016 Ronda & Boland describieron la presencia de este receptor en el núcleo, citoplasma, microsomas y mitocondrias de células de músculo esquelético de la línea C2C12. Por lo anterior, en este estudio se evaluó la participación del GPER en la mediación de los efectos de (-)-EPI sobre las mitocondrias de la línea celular C2C12 de músculo esquelético de ratón. De acuerdo con estudios previos en esta misma línea celular (Ronda y Boland, 2016) nuestros resultados confirman la presencia del GPER en el citoplasma y en la membrana de los miotubos C2C12. Los resultados de este estudio sugieren que (-)-EPI estimula la biogénesis mitocondrial en células de músculo esquelético y este efecto está mediado al menos parcialmente por el GPER (Figuras 20B y 22). Es posible que el receptor también esté presente en la mitocondria y que medie los efectos de (-)-EPI directamente sobre el organelo. Se ha descrito previamente los efectos directos de (-)-EPI en la función mitocondrial (Kopustinskiene et al., 2015), de igual forma se ha demostrado que E2 actúa directamente sobre la función mitocondrial (Borrás et al., 2003), posiblemente mediante la unión a receptores de estrógenos. Por lo anterior es posible que los efectos de (-)-EPI en mitocondrias de la línea C2C12 sean mediados por receptores GPER presentes en la mitocondria o por acción coordinada del GPER en diferentes sitios celulares.

Mediante el análisis de diversos marcadores de biogénesis mitocondrial, como Mitotracker, ELISA, y evaluación de proteínas por Western blot demostramos un incremento en todos los marcadores evaluados que indican un aumento en la biogénesis y abundancia mitocondrial estimulados por (-)-EPI (Figuras 18-20). Este aumento en la abundancia mitocondrial está de acuerdo con los estudios realizados por Moreno-Ulloa y colaboradores en un modelo *in vivo* con ratones suplementados con una dosis oral diaria de (-)-EPI de 1mg/Kg de peso durante 14 días (Moreno-Ulloa, Nogueira, et al., 2015). El aumento en la abundancia mitocondrial corresponde con el aumento observado en la expresión de factores de transcripción como NRF-2, que promueve la síntesis de diversas subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales. De manera similar, el tratamiento con (-)-EPI también induce un aumento de los niveles de TFAM. Este cofactor promueve la síntesis y transcripción del DNA mitocondrial (Scarpulla, 2008). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con (-)-EPI podría inducir tanto la biogénesis mitocondrial como la actividad de los complejos respiratorios.

Por otro lado, utilizamos G-1, agonista específico del GPER, como un control positivo para evaluar los efectos de biogénesis mediados por el GPER. Los resultados indican que (-)-EPI es más eficaz que G-1 en la

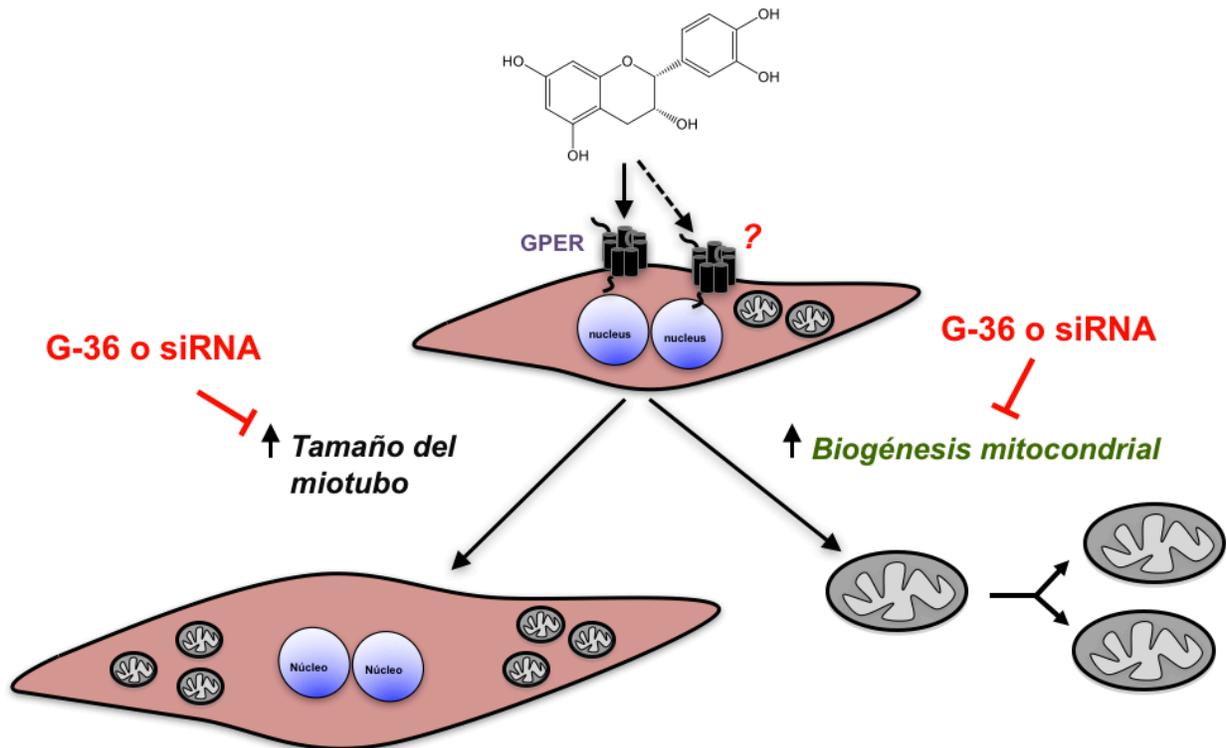
estimulación de los parámetros de biogénesis mitocondrial evaluados. Una posibilidad que explica lo anterior es que (-)-EPI sea más eficaz activando al GPER. Cabe mencionar que la concentración de (-)-EPI utilizada en este estudio (10  $\mu\text{M}$ ) es mayor que la utilizada para G-1 (0.1  $\mu\text{M}$ ) y esto podría afectar la activación del receptor. Sin embargo, no se pudo utilizar una concentración mayor de G-1 puesto que se observaron efectos tóxicos sobre las células a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ .

Adicionalmente, en este trabajo encontramos que el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  (-)-EPI provoca un aumento en el tamaño de los miotubos (largo y ancho). Se ha observado en células HeLa que existe una relación entre el tamaño celular y la abundancia mitocondrial, es decir que cuando la célula aumenta su tamaño existe un incremento correspondiente en el número de mitocondrias. Aunque la relación tamaño-función no es del todo clara, en algunos tipos celulares el aumento en el tamaño está correlacionado con una mayor actividad celular, p.ej., mayor producción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas (Miettinen & Björklund, 2017). Por lo tanto, se podría pensar que el aumento que observamos en el tamaño de los miotubos se relacione con un potencial aumento en su función.

Las células musculares tienen una alta demanda energética y por lo tanto son ricas en mitocondrias. En este estudio se evaluó la actividad mitocondrial mediante la cuantificación de la actividad de la citrato sintasa, enzima que cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs, y se observó un incremento en la actividad de la enzima con el tratamiento de (-)-EPI 10  $\mu\text{M}$ . Este resultado apoya la idea de que el tratamiento con (-)-EPI aumenta la actividad mitocondrial y no sólo el número de mitocondrias.

Recientemente se ha demostrado que la unión de (-)-EPI al receptor de opioides  $\delta$  está implicada en los efectos de protección cardíaca observados con el tratamiento de una dosis diaria de 5mg/Kg de peso durante 10 días en un modelo de ratones (Panneerselvam et al. , 2014). Esto sugiere que (-)-EPI también tiene la capacidad de unirse y activar a otros receptores. Esta capacidad de unión a otros receptores debe ser estudiada a detalle ya que representa otro nivel de complejidad en la señalización celular iniciada por (-)-EPI. Se ha visto que los flavanoles como (-)-EPI se unen a sitios específicos de la membrana llamados balsas lipídicas, regiones de la membrana ricas en esfingolípidos y colesterol que contienen un número de proteínas implicadas en la señalización celular como los receptores de tirosina cinasa y los receptores acoplados a proteínas G, por mencionar algunos (Fraga & Oteiza, 2011). Esto sugiere que (-)-EPI podría unirse a regiones membranales donde se encuentre el GPER, entre otros receptores de membrana, e iniciar casadas de señalización implicados en la biogénesis mitocondrial.

Tomando en cuenta los resultados de este trabajo y los antecedentes, se propone el siguiente mecanismo de acción (Figura 23): (-)-EPI actúa parcialmente a través del GPER y tiene efectos sobre la estimulación de la biogénesis mitocondrial y sobre la morfología celular. No obstante, el GPER no es el único receptor implicado en la mediación de los efectos de (-)-EPI sobre los miotubos C2C12 y los resultados de este estudio sugieren que posiblemente hay otros receptores implicados en estos efectos.



**Figura 23. Mecanismo de acción de (-)-EPI sobre GPER en células de músculo C2C12.** (-)-EPI se une a GPER, el cual puede estar localizado en la membrana plasmática o intracelularmente (se necesitan más estudios para comprobarlo). GPER promueve promotores de la transcripción de proteínas mitocondriales implicadas en la biogénesis mitocondrial como NRF-2 el cuál promueve la transcripción de proteínas de los complejos de respiración y TFAM, el cual promueve la transcripción de proteínas codificadas en el DNA mitocondrial.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

(-)-EPI a una concentración de 10  $\mu$ M estimula la biogénesis mitocondrial en miotubos C2C12 de acuerdo con lo observado en el incremento en los marcadores evaluados (proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial, abundancia mitocondrial y marcadores indicadores de la actividad).

La biogénesis y abundancia mitocondrial es estimulada por (-)-EPI de una mejor manera comparada con los efectos de G-1, este agonista presentó toxicidad a la concentración de 1  $\mu$ M.

(-)-EPI-incrementó el largo y ancho de los miotubos C2C12, no así G-1. Estos efectos sobre la longitud celular fueron inhibidos por el antagonista G-36.

Por lo anterior (-)-EPI estimula la biogénesis mitocondrial en miotubos C2C12 y estos efectos son mediados parcialmente por el GPER.

## Literatura Citada

---

- Anklam, E., Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao* : Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, *33*(7), 423–447. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)
- Barnett, C. F., Moreno-Ulloa, A., Shiva, S., Ramirez-Sanchez, I., Taub, P. R., Su, Y., ... Villarreal, F. (2015). Pharmacokinetic, partial pharmacodynamic and initial safety analysis of (-)-epicatechin in healthy volunteers. *Food & Function*, *6*(3), 824–33. <http://doi.org/10.1039/c4fo00596a>
- Barton, M. (2012). Position paper : The membrane estrogen receptor GPER – Clues and questions. *Steroids*, *77*(10), 935–942. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.04.001>
- Barton, M. (2016). Not lost in translation : Emerging clinical importance of the G protein- coupled estrogen receptor GPER q. *Steroids*, *111*, 37–45. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.02.016>
- Bhattacharjee, R., & Kumar, P. L. (2007). 7 Cacao. In C.Kole (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants* (Vol. 6, pp. 127–142). Berlin.
- Bishop, D. J., Granata, C., & Eynon, N. (2014). Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content ? *Biochimica et Biophysica Acta*, *1840*(4), 1266–1275. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.012>
- Brioche, T., Pagano, A. F., Py, G., & Chopard, A. (2016). Muscle wasting and aging: Experimental models, fatty infiltrations, and prevention. *Molecular Aspects of Medicine*, *50*, 56–87. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.006>
- Bruni, F., Polosa, P. L., Gadaleta, M. N., Cantatore, P., & Roberti, M. (2010). Nuclear Respiratory Factor 2 Induces the Expression of Many but Not All Human Proteins Acting in Mitochondrial DNA Transcription and Replication \* □. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(6), 3939–3948. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.044305>
- Caleb E. Finch. (1976). The Regulation of Physiological Changes During Mammalian Aging. *Chicago Journals*, *51*(1), 49–83.
- Calvo, S. E., & Mootha, V. K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *11*, 25–44. <http://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141720>
- Carter, H. N., Chen, C. C. W., & Hood, D. a. (2015). Mitochondria, Muscle Health, and Exercise with Advancing Age. *Physiology*, *30*(3), 208–223. <http://doi.org/10.1152/physiol.00039.2014>
- Chen, J. Q., Yager, J. D., & Russo, J. (2005). Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1746*(1), 1–17. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.08.001>
- Colombo, M. L., Pinorini-godly, M. T., & Conti, A. (2012). of the Cacao Tree. In F. V. Ario Conti, Andrea Poli, Rodolfo Paoletti (Ed.), *Chocolate and Health* (pp. 41–62). Milan. <http://doi.org/10.1007/978-88-470-2038-2>

- Consuelo Borrás, Juan Sastre, David García-Sala, Ana Lloret, Federico V. Pallardó, J. V. (2003). MITOCHONDRIA FROM FEMALES EXHIBIT HIGHER ANTIOXIDANT GENE. *Free Radical & Biology Medicine*, 34(5), 546–552. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01356-4](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01356-4)
- Cooper, C., & Sayer, A. A. (2012). Nutrition and Sarcopenia : A Review of the Evidence. *Aging Research*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/510801>
- Cotelle, N. (2001). Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 569–590.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., Crozier, A., Jaganath, B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics : chemistry , bioavailability and effects on health. *Natural Products Report*, 26(8), 965–1096. <http://doi.org/10.1039/b802662a>
- Dorn, G. W., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2015). Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes and Development*, 29(19), 1981–1991. <http://doi.org/10.1101/gad.269894.115>
- Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17(2), 162–184. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>
- Emery, A. E. H. (2002). Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscular Disorders*, 12, 343–349.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., Frackelton, A. R., & Surgery, E. J. F. (2000). Estrogen-Induced Activation of Erk- 1 and Erk-2 Requires the G Protein- Coupled Receptor Homolog , GPR30 , and Occurs via Trans - Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, 14(10), 1649–1660.
- Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2011). Free Radical Biology & Medicine Dietary flavonoids : Role of ( - ) -epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(4), 813–823. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.002>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195. <http://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Fu, X., & Simoncini, T. (2008). Critical Review Extra-nuclear Signaling of Estrogen Receptors. *IUBMB Life*, 60(8), 502–510. <http://doi.org/10.1002/iub.80>
- Gabriela Gutierrez-Salmeana, Theodore P. Ciaraldib, Leonardo Nogueira, Jonathan Barboza, Pam R. Taub, Michael C. Hoganb, Robert R. Henry, Eduardo Meaneya, Francisco Villarreal, Guillermo Ceballos, I. R.-S. (2014). Effects of ( - ) -epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 91–94. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.007>
- Hewitt, S. C., & Korach, K. S. (2002). Estrogen Receptors : Structure , Mechanisms and Function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3, 193–200.
- Hood, D. A., Uguccioni, G., & Vainshtein, A. (2011). Mechanisms of Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle : Implications for Health and Disease. *Comprehensive Physiology*, 1(July), 1119–1134. <http://doi.org/10.1002/cphy.c100074>

- Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Ockl, P. S. T., Urr, P. J., & Gnaiger, E. (2004). Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochemical Society*, 928, 919–928.
- Israel Ramirez-Sanchez, Pam R. Taub, Theodore P. Ciaraldi, Leonardo Nogueira, Taylor Coe, Guy Perkins, Michael Hogan, Alan S. Maisel, Robert R. Henry, G. C. and F. V. (2013). (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *International Journal of Cardiology*, 168(4), 3982–3990. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.089>
- J. Robert. (2015). G protein Coupled Receptors. In J. Robert (Ed.), *Textbook of Cell Signalling in Cancer: An Educational Approach* (pp. 77–92). Suiza: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-14340-8>
- Jonghyun Shin, Marjan M. Tajrishi, Yuji Ogura, and A. K. (2014). Wasting Mechanisms in Muscular Dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2266–2279. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.001>. Wasting
- Jornayvaz, François R., G. I. S. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochemistry*, 47, 1–15. <http://doi.org/10.1042/bse0470069>. Regulation
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation ☆. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 794–807. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>
- 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 Research International*, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/232836>
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13, 1–11. <http://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Levin, E. R. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. *Cell Press*, 20(10), 472–482. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.009>
- Maik Hüttemann, Icksoo Lee, M. H. M. (2012). ( % ) -Epicatechin maintains endurance training adaptation in mice after 14 days of detraining. *FASEB*, 26, 1413–1421. <http://doi.org/10.1096/fj.11-196154>
- Mathivadhani Panneerselvam, Sameh S. Ali, J. Cameron Finley<sup>1</sup>, Sarah E. Kellerhals, Michael Y. Migita, Brian P. Head, Piyush M. Patel, David M. Roth, and H. H. P. (2014). Epicatechin regulation of mitochondrial structure and function is opioid receptor dependent. *Molecular Nutrition Food Research*, 76(October 2009), 211–220. <http://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>. Plastid
- Mccullough, M. L., Chevaux, K., Jackson, L., Preston, M., Martinez, G., Schmitz, H. H., ... Hollenberg, N. K. (2006). Hypertension, the Kuna, and the Epidemiology of Flavanols Marjorie. *Cardiovas Pharmacol*, 47(2), 103–109.
- Meyer, M. R., Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G protein-coupled estrogen receptor GPER / GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascular Pharmacology*, 55(1–3), 17–25. <http://doi.org/10.1016/j.vph.2011.06.003>
- Miettinen, T. P., & Björklund, M. (2017). Mitochondrial Function and Cell Size : An Allometric

- Relationship. *Trends in Cell Biology*, 27(6), 393–402. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.02.006>
- Mikes, Z., Ku, J., Weber, K., Bru, P., Klingenspor, M., Wiesner, R. J., ... Pathology, M. (2002). Biogenesis Specifically in Skeletal Muscle. *Endocrinology*, 143(1), 177–184.
- Miquel, J., Field, M., & Jose, S. (1980). ~ROLE IN CELL AGING ECONOMOST,. *Experimental Gerontology*, 15(1974), 575–591.
- Moreno-ulloa, A., Cid, A., Rubio-gayosso, I., Ceballos, G., Villarreal, F., & Ramirez-sanchez, I. (2013). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Effects of ( À ) -epicatechin and derivatives on nitric oxide mediated induction of mitochondrial proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(15), 4441–4446. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.079>
- Moreno-Ulloa, A., Mendez-Luna, D., Beltran-Partida, E., Castillo, C., Guevara, G., Ramirez-Sanchez, I., ... Villarreal, F. (2015). The effects of (-)-epicatechin on endothelial cells involve the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *Pharmacological Research*, 100, 309–320. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.014>
- Moreno-ulloa, A., Nogueira, L., Rodriguez, A., Barboza, J., Hogan, M. C., Ceballos, G., ... Ramirez-sanchez, I. (2015). The Mitochondria ' s Role in the Aging Process Original Article Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis , Oxidative Stress , and Aging With ( - ) -Epicatechin in Senile Mice. *Journals of Georontology:Biological Sciences*, 70(11), 1370–1378. <http://doi.org/10.1093/gerona/glu131>
- Moreno-Ulloa, A., Nogueira, L., Rodriguez, A., Barboza, J., Hogan, M. C., Ceballos, G., ... Ramirez-Sanchez, I. (2015). Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress, and Aging With (-)-Epicatechin in Senile Mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(11), 1370–1378. <http://doi.org/10.1093/gerona/glu131>
- Neumann, E., Khawaja, K., & Müller-ladner, U. (2014). REVIEWS G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nature Publishing Group*, 1–8. <http://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.62>
- Nisoli, E., & Carruba, M. O. (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119, 2855–2862. <http://doi.org/10.1242/jcs.03062>
- Nogueira, L., Ramirez-Sanchez, I., Perkins, G. A., Murphy, A., Taub, P. R., Ceballos, G., ... Malek, M. H. (2011). (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *The Journal of Physiology*, 589(18), 4615–4631. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209924>
- Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., & Lolait, S. J. (1996). Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt ' s Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues communication both in CNS and and in peripheral tissues . Interest has recently focussed also saimiri exert. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(1654), 285–292.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–8. <http://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pascual, V., Valls, R. M., & Solà, R. (2009). Cacao y chocolate: ¿un placer cardiosaludable? *Clinica E Investigacion En Arteriosclerosis*, 21(4), 198–209. [http://doi.org/10.1016/S0214-9168\(09\)72047-9](http://doi.org/10.1016/S0214-9168(09)72047-9)

- Patel, T. B. (2004). Single Transmembrane Spanning Heterotrimeric G Protein-Coupled Receptors and Their Signaling. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 371–385. <http://doi.org/10.1124/pr.56.3.4.1>
- Prossnitz, E. R., & Arterburn, J. B. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology . XCVII . G Protein – Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacological Reviews*, 127731(July), 505–540.
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Publishing Group*, 7(12), 715–726. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology : New insights into GPER function and clinical opportunities. *MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY*, 1421. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002>
- Relaix, F., & Zammit, P. S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration : the cell on the edge returns centre stage. *Development*, 139, 2845–2856. <http://doi.org/10.1242/dev.069088>
- Revankar, C. M. (2005). A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science*, 307(5715), 1625–1630. <http://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Roger A. Fielding, Bruno Vellas, , William J. Evans, Shalender Bhasin, John E. Morley, Anne B. Newman, Gabor Abellan van Kan, Sandrine Andrieu, Juergen Bauer, Denis Breuille, Tommy Cederholm, Julie Chandler, Capucine De Meynard, Lorenzo Donini, Tamara Harr, M. Z. (2011). Sarcopenia: An undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: Prevalence, etiology, and consequences. International Working Group on Sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc*, 12(4), 249–256. <http://doi.org/10.1016/j.jamda.2011.01.003>. Sarcopenia
- Ronda, A. C., & Boland, R. L. (2016). Intracellular Distribution and Involvement of GPR30 in the Actions of E2 on C2C12 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(3), 793–805. <http://doi.org/10.1002/jcb.25369>
- Russell, A. P., Foletta, V. C., Snow, R. J., & Wadley, G. D. (2014). Skeletal muscle mitochondria: A major player in exercise, health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), 1276–1284. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.016>
- S. Burattini, P. Ferri, M. Battistelli, R. Curci, F. Luchetti, E. F. (2004). C 2 C 12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*, 48(3), 223–233.
- Sanders, R. D., Brian, D., & Maze, M. (2008). G-Protein-Coupled Receptors. In J. S. and H. Schwilden (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 93–117). Berlin: Springer.
- Scarpulla, R. C. (2008). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiology Review*, 88, 611–638. <http://doi.org/10.1152/physrev.00025.2007>.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., ... Hammock, B. D. (2006). (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*, 103(4), 1024–1029.
- Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., & H??ttemann, M. (2015). Molecular mechanisms and therapeutic effects of (–)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes,

and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.  
<http://doi.org/10.1155/2015/181260>

Tomé-carneiro, J., Larrosa, M., González-sarrías, A., Tomás-barberán, F. A., Teresa, M., & Espín, J. C. (2013). Resveratrol and Clinical Trials : The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence. *Current Pharmaceutical Designs*, 19, 6064–6093.

Uldry, M., Yang, W., St-pierre, J., Lin, J., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metabolism*, 3(May), 333–341. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.002>

Warburton, D. E. R., Nicol, C. W., & Bredin, S. S. D. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, 174(6), 801–9.  
<http://doi.org/10.1503/cmaj.051351>