



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS**

**“CAMBIOS EN LAS FIBRAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO INDUCIDOS
POR GLUCOCORTICOIDES Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE
EXPRESIÓN DEL GEN *MSTN* EN RATAS”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:
IBQ. VINICIO ORTIZ TINOCO**

**A S E S O R:
DR. ZURISADDAI HERNÁNDEZ GALLEGOS**

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DEL 2009.

IIQB

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología del **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas**, y en el laboratorio de Biotecnología Animal del **Centro Multidisciplinario de Estudios Biotecnológicos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**. El trabajo se desarrolló bajo la dirección del **DC. Zurisaddai Hernández Gallegos**. Para la realización de este trabajo se agradece apoyo del CONACYT (beca de maestría 211434), el COECyT y la CIC-UMSMH.

DEDICATORIA

A mi esposa y mis hijos, por su fortaleza, amor y paciencia.

A mis padres y hermanos, con amor y gratitud, por su aliento en la realización de mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Zurizaddai Hernández Gallegos por darme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección, por contribuir con sus conocimientos en mi formación y por darme la oportunidad de aprender de su persona. Gracias por su tiempo y su invaluable apoyo brindado en el presente trabajo.

Al Dr. Marcos Cajero Juárez por su apoyo y ayuda en la realización de esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Por abrirme sus puertas y facilitarme los elementos necesarios para mi formación.

Al Centro Multidisciplinario de Estudios Biotecnológicos (CMEB) y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH. Por haberme facilitado el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis.

A la Dra. Luz Torner del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) del Instituto Michoacano del Seguro Social (IMSS), por su colaboración y ayuda en la realización del análisis morfométrico del músculo gastrocnemio.

A la Dra. Carmen Aceves Velasco del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su colaboración y ayuda en la cuantificación de la expresión del gen *Mstn*.

A la comisión revisora de esta tesis, M.C. Héctor Urquíza Marín, Dr. Carlos Sosa Aguirre, Dr. Daniel Godínez y Dr. José López Bucio, por sus sugerencias que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A mis compañeros del IIQB y del CMEB por su aliento y apoyo.

A mis padres, hermanos, esposa e hijos por su cariño, orientación y por darme la fuerza para completar mis estudios de posgrado.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINAS
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estructura y función del músculo esquelético.....	1
1.2 Formación del músculo esquelético.....	3
1.2.1 Miogénesis.....	3
1.2.2 Desarrollo posnatal.....	4
1.2.2.1 Crecimiento del músculo esquelético y atrofia muscular.....	4
1.3 La miostatina.....	5
1.3.1 Estructura y biosíntesis de la miostatina.....	8
1.3.2 Función y regulación de la miostatina.....	10
1.3.2.1 Función de la miostatina en la proliferación de mioblastos.....	12
1.3.2.2 Función de la miostatina en la diferenciación de mioblastos.....	14
1.3.2.3 Efecto biológico de la inhibición de la actividad de la proteína miostatina en la masa muscular.....	16
1.3.3 Miostatina en la atrofia muscular.....	17
1.3.4 Regulación de la expresión del gen <i>Mstn</i>	18

1.4 Glucocorticoides.....	19
1.4.1 Atrofia muscular inducida por glucocorticoides.....	24
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos particulares.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Animales.....	28
5.2 Administración de glucocorticoides.....	28
5.3 Análisis histológico del músculo esquelético.....	28
5.3.1 Obtención de los cortes histológicos del músculo gastrocnemio.....	28
5.3.2 Tinción con hematoxilina y eosina.....	29
5.3.3 Análisis morfométrico de los cortes histológicos.....	30
5.4 Análisis de la expresión del gen <i>Mstn</i>	30
5.4.1 Extracción de ARN total.....	30
5.4.2 Síntesis de ADN complementario.....	31
5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
5.4.4 PCR en tiempo real.....	32
5.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	34
5.5.1 Electroforesis del ARN.....	34
5.5.1 Electroforesis del ADN.....	34

6. RESULTADOS.....	37
6.1 Cambios en el peso corporal de las ratas durante el tratamiento con dexametasona, triamcinolona o betametasona.....	37
6.2 Efectos de dexametasona, triamcinolona o betametasona sobre el peso del músculo gastrocnemio.....	37
6.3 Efectos de los GC sobre el diámetro y la distribución de las fibras musculares en el músculo gastrocnemio de rata.....	40
6.4 Detección de la expresión del gen <i>Mstn</i> en el músculo gastrocnemio.....	44
6.5 Expresión diferencial del gen <i>Mstn</i> en respuesta a dexametasona, triamcinolona y betametasona.....	44
7. DISCUSIÓN.....	47
7.1 Cambios en el peso corporal de las ratas.....	47
7.2 Evaluación de los efectos de los glucocorticoides sobre el músculo esquelético.....	48
7.2.1 Peso del músculo gastrocnemio.....	48
7.2.2 Cambios en el tamaño de las fibras musculares.....	49
7.3 Análisis de la expresión del gen <i>Mstn</i> en el músculo gastrocnemio.....	51
7.3.1 Detección de la expresión del gen <i>Mstn</i>	51
7.3.2 Análisis de la expresión del gen <i>Mstn</i> en respuesta a los GC.....	51
7.4 Consideraciones generales.....	53
8. CONCLUSIONES.....	55
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

1 Estructura del músculo esquelético.....	2
2 Fenotipo doble músculo.....	7
3 Estructura y procesamiento de la miostatina.....	9
4 Activación del complejo latente TGF- β	11
5 Vía de señalización de la miostatina.....	13
6 Función de la miostatina en el crecimiento del músculo esquelético.....	15
7 Estructuras moleculares de los glucocorticoides.....	20
8 Mecanismos de acción de los glucocorticoides.....	23
9. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	36
10. Diferencias en el peso corporal de las ratas durante el tratamiento con GC...	38
11. Efecto de los GC sobre el peso (en gramos) del músculo gastrocnemio de ratas.....	39
12. Cortes transversales del músculo gastrocnemio de ratas tratadas con GC....	41
13. Distribución de frecuencia de las fibras musculares de las ratas tratadas con dexametasona.....	42
14. Distribución de frecuencia de las fibras musculares de las ratas tratadas con triamcinolona.....	42
15. Distribución de frecuencia de las fibras musculares de las ratas tratadas con betametasona.....	43
16. Cambios en el número de fibras musculares inducida por glucocorticoides...	43
17. ARN total de músculo gastrocnemio de rata.....	45
18. Identificación y amplificación del gen <i>Mstn</i> mediante la técnica RT-PCR.....	45
19. PCR-tiempo real del gen <i>Mstn</i>	46

ÍNDICE DE TABLAS

1. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de PCR..... 32

ABREVIATURAS

A	Adenina
ActRIIB	Receptor de membrana activina tipo IIB
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Akt	Proteína kinasa B
AP-1	Proteína activadora-1
ARN	Acido ribonucleico
ARE	Elemento de respuesta a andrógenos
ARNm	ARN mensajero
Asp	Asparagina
β -act3	Oligonucleótido antisentido para el gen de β -actina
β -act5	Oligonucleótido sentido para el gen de β -actina
BMP-1	Proteína ósea morfogénica
C	Citosina
°C	Grados Celsius
CDKs	cinasa dependiente de ciclinas
CKIs	Inhibidores de la CDK
CRE	Elementos de respuesta a AMP cíclico
DM	Doble músculo
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
4E-BP	Proteína de unión a eIF4E
E2F	Factor de transcripción
E2	Ubiquitina
E3	Ubiquitina-ligasa 3
ER	Elemento respuesta
FoxO	Factor de transcripción
G	Guanina
GC	Glucocorticoide y/o glucocorticoides

GDF-8	Factor de diferenciación y crecimiento-8
GRE	Elemento respuesta a glucocorticoides, por sus siglas en inglés.
GR	Receptor de glucocorticoides, por sus siglas en inglés.
gr	Gramos
Hsp-90	Proteína de choque térmico-90
HCl	Acido clorhídrico
IGF-1	Factor de crecimiento-1 parecido a la insulina.
kDa	Kilo Dalton.
KO	Knock-out
Kg	Kilogramos
LAP	Péptido latente.
LTBPs	Proteínas latentes de unión a los TGF- β .
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
μ g	Microgramo
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
μ m	Micrómetro
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
MEF-2	Factores potenciadores miogénicos.
<i>Mstn</i>	Gen de la miostatina.
MRFs	Factores de regulación miogénica.
MRF4	Factor de regulación miogénica-4.
mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos.
MuRF1	muscle RING-finger protein-1
Myf5	Factor miogénico-5.
MyoD	Diferenciación miogénica 1.
MYO3	oligonucleótido antisentido para el gen de la miostatina
MYO5	oligonucleótido sentido para el gen de la miostatina.
NaCl	Cloruro de sodio

NF- κ B	Factor nuclear-KB
nGRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides negativos
nM	Nanomolar
Pax	Paried-box por sus siglas en inglés.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	PCR en tiempo real
p21	Proteína inhibidora de cinasa dependiente de ciclina
pb	Par de bases
PI3K	Fosfoinositol Kinasa-3
pM	Picomolar
POU	Proteína de unión octamerica
POMC	Pro-opiomelanocortina
PPAR- γ	Receptor con actividad proliferativa peroxisomal- γ
RNasin	Inhibidor de ARNasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
S6K1	Proteína ribosomal cinasa S6
T	Timina
TBE	Solución tris/borato/EDTA
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TRACT3	Oligonucleótido antisentido para el gen de β -actina-PCR en tiempo real.
TRACT5	Oligonucleótido sentido para el gen de β -actina- PCR en tiempo real.
TRE	Elementos de respuesta a la hormona tiroidea.
TRMYO3	Oligonucleótido antisentido para el gen miostatina-PCR en tiempo real.
TRMYO5	Oligonucleótido sentido para el gen miostatina-PCR en tiempo real.
U	Unidades de enzima.
UPS	Sistema proteosoma ubiquitina
V	Volts
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.

RESUMEN.

Los glucocorticoides (GC) son utilizados ampliamente en la medicina humana y veterinaria, como potentes antiinflamatorios e inmunosupresores, sin embargo su uso se ha asociado con atrofia muscular. Los GC son una amplia familia de compuestos con un núcleo estructural común pero con diferentes grupos sustituyentes o funcionales. Los efectos farmacológicos de los GC resultan de la activación y/o represión de la expresión génica al interactuar con elementos de respuestas a GC (GRE) presentes en la secuencia del promotor de genes diana. Estudios recientes muestran que el gen que codifica para la proteína miostatina (*Mstn*), que es el principal regulador negativo de la masa muscular, presenta en su región promotora varios sitios GRE, encontrándose que la dexametasona aumenta los niveles de expresión del gen *Mstn* en músculo esquelético. Este incremento se ha asociado con atrofia del músculo esquelético. Por otra parte, en estudios de células de epitelio mamario bovino, se observó que la expresión del gen *Mstn* se incrementa o disminuye dependiendo del tipo (estructura) del GC empleado. El propósito del presente trabajo fue evaluar los cambios musculares inducidos por tres GC y su relación con los niveles de expresión del gen *Mstn* en músculo gastrocnemio de ratas. Los animales recibieron diariamente concentraciones equimolares (1.53 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de peso corporal) de dexametasona, betametasona o triamcinolona por 5 días. La dexametasona y triamcinolona, provocaron una reducción en la masa del músculo gastrocnemio y una disminución en el tamaño de las fibras musculares, aunque estos cambios fueron de menor magnitud en las ratas tratadas con triamcinolona. Mientras que el tratamiento con betametasona solo provocó ligeros cambios en el tamaño de las fibras musculares que no tuvieron un efecto sobre el peso del músculo gastrocnemio. Finalmente, los tres GC utilizados provocaron un incremento diferente en la expresión del gen *Mstn*, siendo de mayor magnitud el inducido por dexametasona. Las diferencias observadas en los tres tratamientos, nos indican que nivel de expresión del gen *Mstn* en músculo esquelético de rata depende del GC empleado, existiendo una relación directa entre el nivel de expresión del gen *Mstn* y el grado de atrofia muscular provocado.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GC) are widely used in human and veterinary medicine, as potent anti-inflammatory and immunosuppressive drugs. However, its use has been associated with muscle atrophy. The GC belong to a broad family of compounds with a common structural core but with different substituents or functional groups. Pharmacological effects of GC result from the activation and/or repression of gene expression by interacting with GC response elements (GRE) present in the promoter sequence of target genes. Recent studies show that the promoter sequence of myostatin gene (*Mstn*), contains putative muscle growth response elements for glucocorticoid, suggest that dexamethasone upregulate myostatin expression in muscle cells. Some studies also showed that the high level of expression of *Mstn* is associated with atrophy of skeletal muscle. On the other hand, in studies of bovine mammary epithelial cells, it was found that *Mstn* gene expression is increased or decreased depending on the type (structure) of the GC used. The purpose of this study was therefore to evaluate changes induced by three GC on skeletal muscle (gastrocnemius) and their relationship with levels of *Mstn* gene expression in this muscle. Animals (rats) received daily equimolar concentrations (1.53 $\mu\text{M}/\text{kg}$ body weight) of dexamethasone, betamethasone or triamcinolone for 5 days. Dexamethasone and triamcinolone, caused a reduction in both gastrocnemius muscle mass and muscle fiber size, but the magnitude of these effects were smaller in rat group treated with triamcinolone. Treatment with betamethasone caused only slight changes in muscle fiber size and had no effect on gastrocnemius muscle weight. Finally, the three GC used caused a different level of *Mstn* gene expression in the following order dexamethasone > triamcinolone > betamethasone. Our results indicate that *Mstn* gene expression level in rat skeletal muscle depends on the GC used, and also that there is a direct relationship between *Mstn* gene expression level and degree of muscle atrophy induced.

1.- INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético es el tejido más abundante en los vertebrados, formando aproximadamente el 40% de la masa total del cuerpo. No solo es el sitio de mayor actividad metabólica sino también es el reservorio de proteína más grande, que sirve como una fuente de aminoácidos para ser utilizada en la producción de energía durante periodos de privación de alimentos, actividad física y durante las etapas de crecimiento (Schwartz, 2008).

1.1 Estructura y función del músculo esquelético

El músculo esquelético está compuesto por numerosas células contráctiles (miocitos) conocidas comúnmente como fibras musculares (Figura 1). Cada músculo está rodeado por tejido conectivo en varias envolturas denominadas: epimisio, perimisio y endomisio. Mientras el músculo completo está rodeado por el epimisio, el perimisio agrupa decenas de fibras musculares en forma de fascículos. A su vez el endomisio empaqueta a un gran número de miofibrillas contráctiles dando lugar a la fibra muscular (Marieb y Hoehn, 2007). Las miofibrillas están formadas por pequeñas unidades contráctiles denominadas sarcomeros (delimitados por dos líneas Z) que son la unidad anatómica y funcional del músculo esquelético (Telley *et al.*, 2006). Los sarcomeros son ensambles de dos tipos de proteínas filamentosas: filamentos gruesos, constituidos por miosina, y filamentos delgados constituidos por dos cadenas de actina y una cadena de la proteína nebulina (Gullberg, 2003; Ogut *et al.*, 2003).

En respuesta a las órdenes motoras procedentes del sistema nervioso central, los músculos se contraen para generar fuerza y potencia y, en último término, trabajo. El sarcómero es la estructura responsable de la generación de la fuerza mediante la contracción muscular. Las contracciones musculares coordinadas del músculo esquelético son las que hacen posible el movimiento de todo el cuerpo o de alguna de sus partes (Scott *et al.*, 2001). Otras funciones del músculo esquelético son las de dar estabilidad articular, servir como protección y mantener la postura del cuerpo.

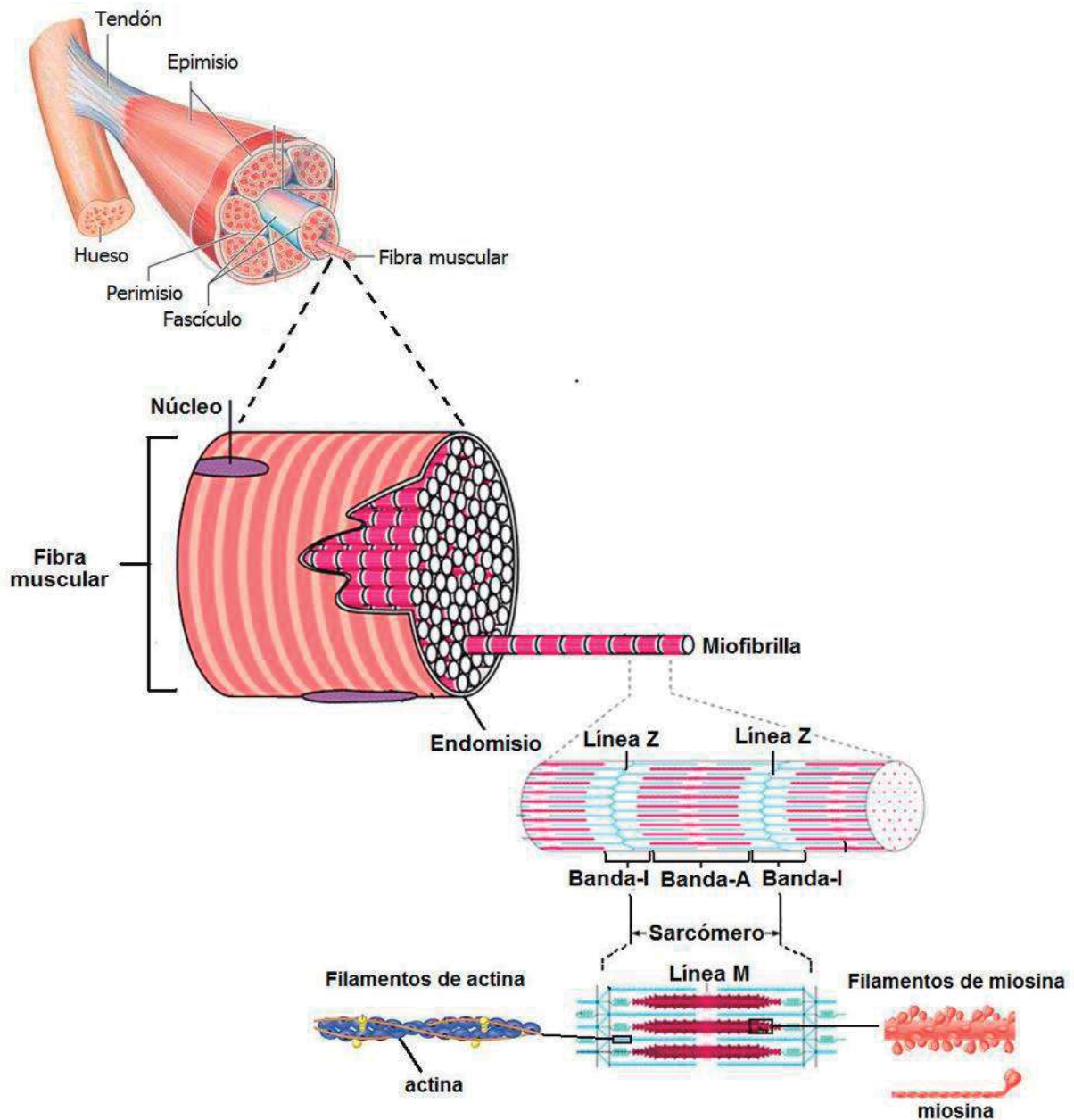


Figura 1. Estructura del músculo esquelético. El músculo esquelético está conformado por fibras musculares empaquetadas en forma de fascículos. Cada fibra muscular está constituida por decenas de miofibrillas, las cuales están conformadas por unidades contráctiles (sarcómeros). A su vez, cada sarcómero está integrado por filamentos de miosina y actina. Adaptado de Marieb y Hoehn, 2007.

1.2 Formación del músculo esquelético.

1.2.1 Miogénesis.

En los vertebrados, el músculo esquelético se genera a partir de la capa del mesodermo, que está constituido por somitas (Christ y Ordahl, 1995). En las etapas tempranas de la miogénesis las somitas se diferencian en las células del dermomiótomo, las cuales dan origen a las células precursoras del músculo esquelético (mioblastos) (Buckingham *et al.*, 2003).

Durante el periodo embrionario de la miogénesis los mioblastos primarios migran al sitio de futura formación del músculo, ahí proliferan, se diferencian en miotubos multinucleados y se fusionan para formar las fibras musculares primarias (Biressi *et al.*, 2007). Durante el desarrollo muscular fetal, se inicia la formación de las fibras musculares secundarias. En esta etapa hay un incremento en el número y diámetro de fibras musculares y un aumento en la nucleación, eventos que ocurren sobre la superficie de las fibras musculares primarias (Velleman, 2007). El número de fibras musculares que se forman durante el desarrollo fetal, define el número de fibras en el músculo posnatal (Graziotti *et al.*, 2000). Por lo tanto, la proliferación y fusión de mioblastos durante el desarrollo del músculo fetal, es un factor determinante en cuanto al número final de fibras musculares formadas. Existen varios factores que controlan o pueden afectar la proliferación de los mioblastos y por lo tanto el tamaño del músculo durante la miogénesis, entre los que tenemos: la inervación del músculo (Duxson y Sheard, 1995; Ross *et al.*, 1987), los factores de crecimiento transformante-beta (TGF- β ; que son discutidos con más detalle en la sección 1.3) (Kollias y McDermott, 2008; Brennan *et al.*, 1991) y los factores de regulación miogénica (MRFs) (Biressi *et al.*, 2007).

Los MRFs son expresados exclusivamente en las células del músculo esquelético (Kim, 2009). Estos presentan un motivo de unión al ADN y regulan la expresión de genes durante la proliferación y la diferenciación de los mioblastos. Los MRFs que rigen el desarrollo del tejido muscular son cuatro: MyoD, Myf5, Miogenina y MRF4 (Stewart y Rittweger, 2006). Estos cuatro factores de transcripción tienen distintas

funciones y se expresan secuencialmente durante la embriogénesis. MyoD y Myf5 se expresan al inicio de la proliferación de los mioblastos y promueven la entrada al ciclo celular (Ishibashi *et al.*, 2005). Mientras que miogenina y MRF4 se expresan durante la fusión de los mioblastos y actúan para promover la diferenciación, así como la salida del ciclo celular (Yafe, 2008).

1.2.2 Desarrollo posnatal.

En el desarrollo posnatal, las fibras musculares generadas durante la miogénesis prenatal sufren un proceso de diferenciación que da lugar a varios tipos de fibras que discrepan en su velocidad de contracción, estructura y propiedades metabólicas (Zierath y Hawley, 2004). Estas diferencias le permiten a las fibras musculares, y por lo tanto al músculo completo, tener capacidades funcionales diferentes, tanto en la actividad física como en la generación de la fuerza. En relación a su velocidad de contracción las fibras musculares se clasifican en dos tipos: las fibras tipo I o de contracción lenta (que se originan a partir de las fibras primarias) y las fibras tipo II o de contracción rápida (formadas a partir de las fibras secundarias) (Agbultu *et al.*, 2004). Las fibras tipo II son susceptibles a muchos factores, tales como la nutrición, la actividad física y los estados patológicos que involucran daño muscular, en tanto que la mayoría de las fibras musculares tipo I son resistentes a estos factores (Dwyer *et al.*, 1994).

1.2.2.1 Crecimiento del músculo esquelético y atrofia muscular.

El músculo esquelético tiene un amplio potencial adaptativo (morfológico y metabólico), esto significa que es capaz de modificar su estructura en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y patológicas, experimentando una ganancia o una pérdida de masa muscular (Flück, 2006; Hood *et al.*, 2006; Röckl, 2007). En relación a los factores fisiológicos que afectan el desarrollo muscular, la actividad física (ejercicios) puede producir un incremento en el tamaño del músculo esquelético, ocasionando el fenómeno conocido como hipertrofia muscular (Bulteau *et al.*, 2008; Legerlotz *et al.*, 2008), contrariamente, muchas afecciones (insuficiencia renal crónica, artritis, SIDA, caquexia de cáncer, enfermedad de Cushing, etc.) tienen

como consecuencia una disminución en el tamaño del músculo esquelético, ocasionando un estado patológico conocido como atrofia muscular (Mitch, 2000; Mitch y Price, 2003).

En la hipertrofia muscular, la tasa de síntesis de proteínas contráctiles es mucho más alta comparado con la tasa de degradación de proteínas, llevando a un crecimiento de las células existentes que incrementan su tamaño o volumen (Sandri, 2007; Bolster *et al.*, 2004). Adicionalmente, el fenómeno de hipertrofia está relacionada también con un incremento en la proliferación de las células satélite (Adams, 2006).

Por el contrario, en la atrofia muscular se presenta una disminución en el diámetro de las fibras musculares ocasionado por un decremento en el contenido de proteínas (Goodpaster *et al.*, 2006; Schwartz, 2008). El desequilibrio en el contenido de proteína muscular, se debe a una disminución en la tasa de síntesis de las proteínas contráctiles y al aumento en la proteólisis, resultando en una reducción en el tamaño de las células existentes (Sandri, 2007; Eley y Tisdale, 2007; Lecker *et al.*, 2004).

Los mecanismos moleculares que controlan la hipertrofia y la atrofia muscular, involucran la activación y/o desactivación de diferentes proteínas que participan en las distintas rutas de señalización específicas del músculo esquelético, como son las proteínas PI3-K/Akt/mTOR/S6K (Glass, 2003), los factores MRFs y los TGF- β , entre los que destaca la miostatina (McPherron y Lee, 1997).

1.3 La miostatina.

Los TGF- β son una superfamilia de factores que desempeñan funciones vitales en la regulación de la miogénesis prenatal y posnatal. Un miembro destacado de esta familia es la miostatina, también conocida como el factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8) (McPherron *et al.*, 1997). La miostatina es un regulador negativo del desarrollo de la masa muscular, de ahí que la pérdida de funcionalidad de la miostatina da como resultado un fenotipo conocido como “doble músculo” (DM). El fenotipo DM fue identificado inicialmente en bovinos de las razas Belga Azul y Piedmontese, que presentan alta producción de carne y que fueron seleccionados durante siglos por genética clásica. Este fenotipo se caracteriza por presentar un

aumento en el crecimiento y desarrollo del músculo esquelético, ocasionado por una condición generalizada de hiperplasia y/o hipertrofia del músculo (Figura 2b). El fenotipo DM también se ha reportado en otras especies de vertebrados: en humanos (Schuelke *et al.*, 2004), en ovejas (Lee, 2007) y en perros (Mosher *et al.*, 2007), como se muestra en las Figuras 2C, D y E, respectivamente. McPherron y Lee (1997) demostraron mediante técnicas de biología molecular que el fenotipo DM era ocasionado por una alteración en la secuencia del gen que codifica para la proteína miostatina (*Mstn*). En bovinos, en el caso de la raza Belga Azul se detectó una supresión de 11 pb (pares de bases) en el tercer exón que da lugar a un cambio en el marco de lectura y un subsecuente codón de paro prematuro, produciéndose un péptido de miostatina truncado e inactivo (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron y Lee, 1997), mientras en la raza Piedmontese se encontró una mutación en el tercer exón del gen *Mstn* debida a una sustitución de cisteína por una tirosina en la región madura de la proteína que evita la formación del homodímero, resultando en la pérdida de función de la miostatina (Kambadur *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 2002). En el caso de humanos (en un niño alemán) se identificó una mutación consistente en la transición de una guanina por una adenina en el intron 1, lo que provocó que la secuencia consenso de corte y empalme no sea reconocida por la maquinaria del espliceosoma, generando la inserción de 108 pb, seguido de un codón de paro prematuro que evita la traducción de la proteína miostatina (Schuelke *et al.*, 2004).

La expresión del gen *Mstn* fue reportada inicialmente por McPherron *et al.* (1997), quienes encontraron que este gen se expresa preferentemente en el músculo esquelético y en menor grado en tejido adiposo (Feldman *et al.*, 2006). Además de estos tejidos, la expresión del gen *Mstn* también se ha reportado en glándula mamaria, tejido cardíaco y óseo (Shaoquan *et al.*, 1998; Morissette *et al.*, 2006; McKoy *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Hamrick *et al.*, 2007). La expresión de la miostatina en músculo esquelético se ha reportado en varias especies de vertebrados: bovinos (Deveaux *et al.*, 2003), cerdos (Patruno *et al.*, 2008), gallinas (Zhiliang *et al.*, 2004), ratones (McPherron *et al.*, 1997) y pescados (Rescan *et al.*, 2001).

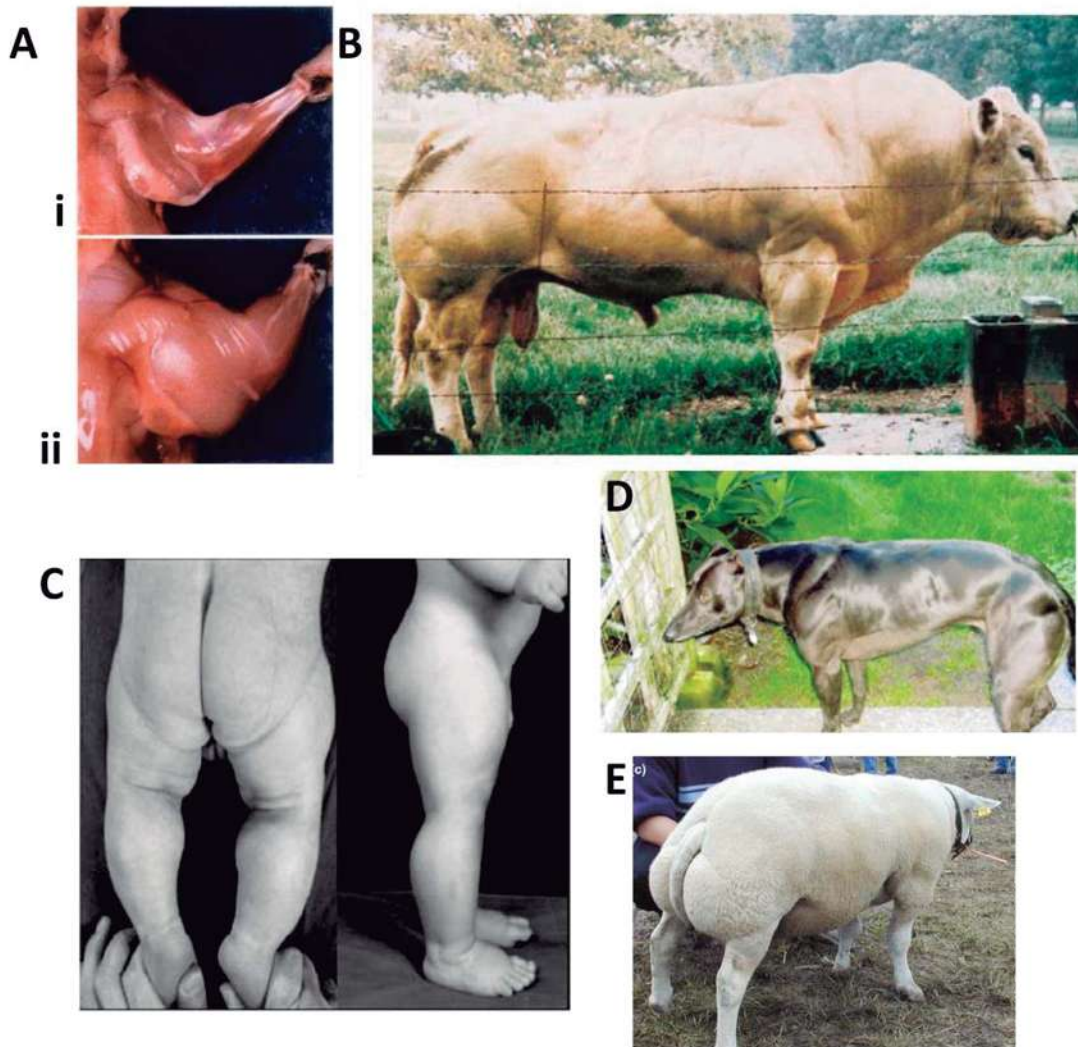


Figura 2. Fenotipo doble músculo (DM). A) Ejemplificación del fenotipo DM en ratones con miostatina nula (ii), en comparación con un fenotipo silvestre (i), adaptado de McPherron *et al.*, 1997. B) Bovino Belga Azul representando el fenotipo DM, adaptado de McPherron y Lee, 1997. C) Fenotipo muscular observado en un niño alemán a los seis días de edad (izquierda) y a los siete meses de edad (derecha), adaptado de Schuelke *et al.*, 2004. D) Fenotipo DM en ovejas, adaptado de Lee, 2007. E) Fenotipo DM en perros, adaptado de Mosher *et al.*, 2007.

1.3.1 Estructura y biosíntesis de la miostatina.

La miostatina se genera a partir del gen *Mstn* que está organizado en tres exones y dos intrones. En los murinos el gen *Mstn* tiene una longitud de 6438 y se compone de tres exones de 500, 374 y 1829 pb respectivamente, que sintetizan un ARNm de 2.7 kb (Royo, 2002). La traducción del ARNm de la miostatina da lugar a un propéptido de 376 aminoácidos (McPherron *et al.*, 1997; Joulia-Ekaza y Cabello, 2007). Tras la clonación del ADNc que codifica a la miostatina en varias especies y el posterior alineamiento de sus secuencias de aminoácidos, se observó un alto grado de conservación en ratón, rata, humano, cerdo, pollo y pavo (100% de identidad en su región C-terminal) (McPherron *et al.*, 1997, Arnold *et al.*, 2001). Este alto porcentaje de conservación en la secuencia de aminoácidos de la miostatina entre distintas especies, sugiere que, posiblemente su función biológica este altamente conservada entre las especies de aves y mamíferos. Como sucede con otros miembros de la familia del TGF- β , la miostatina es sintetizada como una proteína precursora (pro-miostatina) conformada por tres regiones: péptido señal, péptido latente (LAP) y un péptido maduro (Figura 3a) (Lee, 2004). Esta proteína precursora experimenta dos procesamientos proteolíticos para dar lugar a la forma biológica activa (Ríos *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2000). El primer evento de proteólisis de la pro-miostatina se efectúa en el retículo endoplásmico, donde son eliminados 24 aminoácidos (correspondientes al péptido señal) (Figura 3b) (McFarlane *et al.*, 2005; Lee, 2004) y se glicosila un residuo de asparagina del dominio del LAP, que conduce a la formación de dímeros unidos por medio de un puente disulfuro entre las cisteínas de dos péptidos maduros (Figura 3b) (Royo, 2002; Jin *et al.*, 2004; Lee, 2004).

El segundo evento proteolítico ocurre en el aparato de Golgi y es realizado por la endoproteasa furina (Figura 3c) (Thomas, 2002; Jin *et al.*, 2004; McFarlane *et al.*, 2005). La furina reconoce el motivo RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) de la pro-miostatina, liberando los fragmentos del péptido maduro (109 aminoácidos) y los del péptido latente (206 aminoácidos) (Lee, 2004). El péptido maduro (miostatina) es liberado en

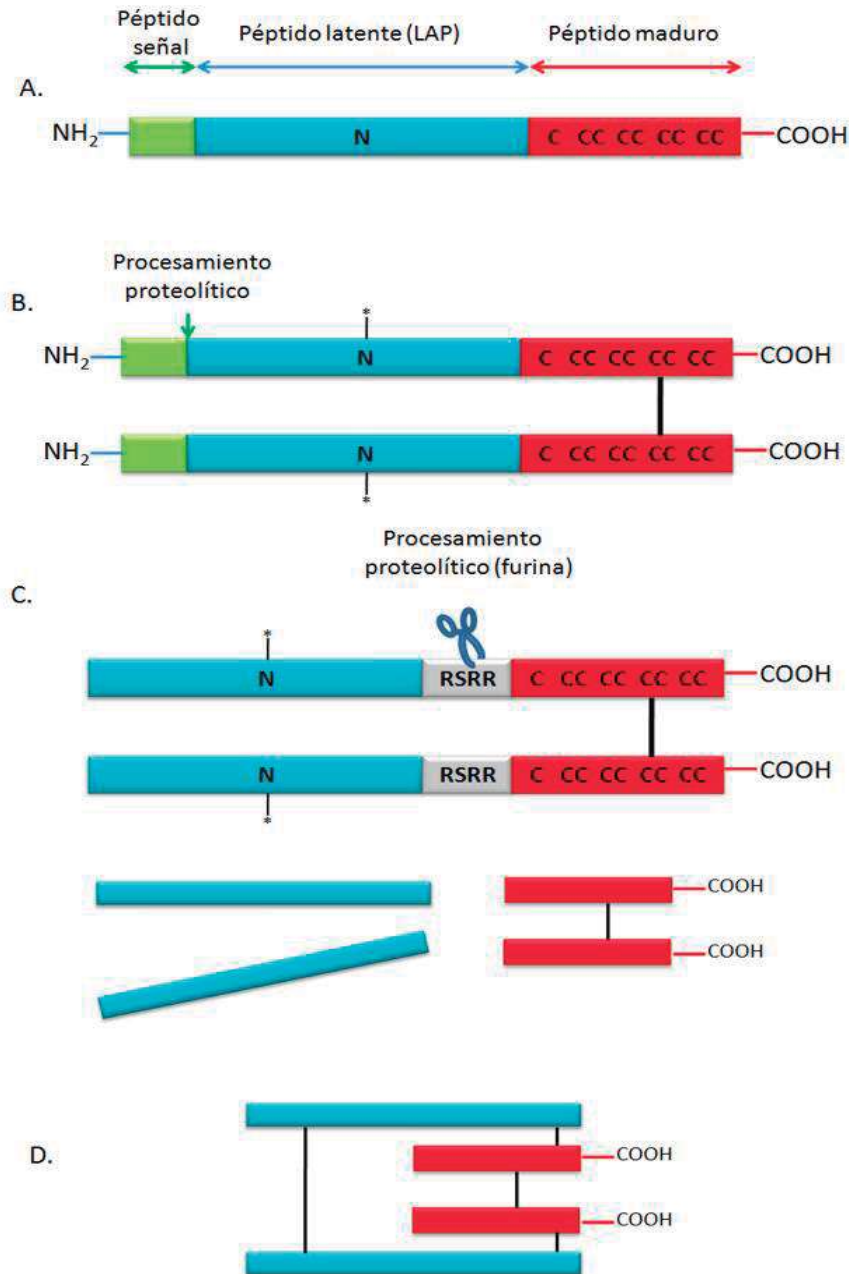


Figura 3. Estructura y procesamiento de la miostatina. A) La miostatina es sintetizada como una proteína precursora que experimenta dos eventos de procesamiento proteolítico. B) El primero elimina el péptido señal en el extremo del amino terminal (verde). C) El segundo procesamiento proteolítico es realizado por la endoproteasa furina, liberando el péptido latente (azul) y el péptido maduro. D) Después del procesamiento, el péptido latente recluta inmediatamente al péptido maduro como un mecanismo de control. Modificado de Lee, 2004.

forma de homodímero (forma biológica activa) de 26 kDa que contiene nueve residuos de cisteína (Zimmers *et al.*, 2002). Las cisteínas se ubican en posiciones típicas conservadas entre los miembros de la familia TGF- β , ocho de ellas participan en la formación de puentes de disulfuro intramoleculares y solo una en la formación de un puente disulfuro intermolecular (McPherron *et al.*, 1997; Fernandez, 2004). Inmediatamente después del procesamiento proteolítico realizado por la furina, el LAP se une al homodímero de miostatina formando un complejo latente (Figura 1.3d) (Lee y McPherron, 2001; Thies *et al.*, 2001). A su vez, el LAP interactúa covalentemente por medio de un puente disulfuro con las proteínas latentes de unión a los TGF- β (LTBPs) formando un complejo denominado complejo latente TGF- β (Figura 4a), el cual es secretado al espacio extracelular y se almacenan en la matriz extracelular (Figura 4b) (Raghunath *et al.*, 1998).

El complejo latente TGF- β unido a la matriz extracelular, es liberado mediante un proceso proteolítico realizado por metaloproteinasas (Gleizes *et al.*, 1997). Este evento proteolítico resulta en el truncamiento de los LBTPs, lo que a su vez expone nuevas regiones del LAP quedando disponible para interactuar con la superficie celular a través del receptor manosa-6-fosfato y sufrir un segundo proceso proteolítico (por la proteasa plasmina o catepsina y miembros de la familia BMP-1/TLD, como la TLL-2) en el residuo Asp-75 y Asp-76 (Figura 4c) (Sato *et al.*, 1993; Taylor, 2008; Wolfman *et al.*, 2003). Este proceso proteolítico, tiene como resultado la liberación del homodímero (miostatina), el cual se une a los receptores de membrana específicos para los TGF- β y activa la ruta de señalización que finaliza en la regulación de la expresión de diversos genes (MyoD, Miogenina, etc).

1.3.2 Función y regulación de la miostatina

Una vez que la miostatina se ha liberado en su forma activa, se produce la unión a los receptores específicos para los TGF- β . Estos receptores son glicoproteínas con un dominio hidrofóbico transmembranal y un dominio intracelular con actividad serina/treonina-cinasa. Se dividen principalmente en dos subfamilias: los receptores tipo II (donde se unen los TGF- β) y los receptores tipo I, que traducen la señal hacia

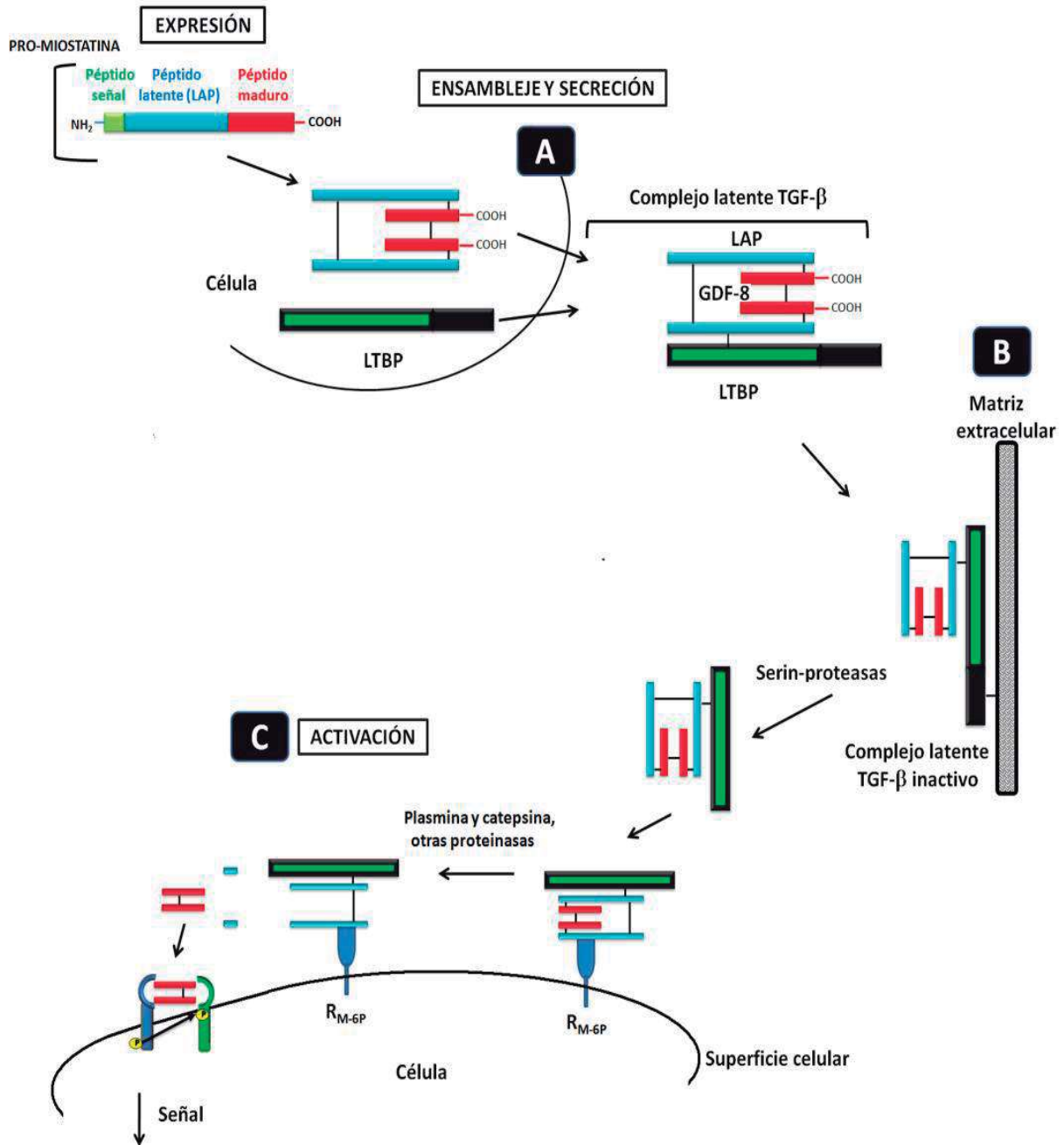


Figura 4 Activación del complejo latente TGF- β . A) El LAP interacciona con la proteína LTBP mediante un enlace bisulfuro para formar el complejo latente TGF- β . B) El cual es secretado al espacio extracelular y se asocia a la matriz extracelular. C) En respuesta a señales específicas, el complejo latente TGF- β se libera por proteólisis y se produce la unión del péptido latente a receptores manosa-6-fosfato de la superficie celular, donde se produce la activación del complejo latente a través de proteasas como la plasmina o la catepsina, que digieren el LAP liberando así el homodímero activo (miostatina). Adaptado y modificado de Gleizes *et al.*, 1997; Schabort, 2007.

el núcleo (Derynck *et al.*, 1998). En estudios realizados por Lee y McPherron (2001), se demuestra que los receptores de activina tipo II particularmente los de tipo IIB; ActRIIB, están involucrados en la señalización de la miostatina.

La unión de la miostatina al receptor ActRIIB, induce la formación de un complejo con receptores tipo I (ALK-4 o ALK5). La constitución dimérica que tiene el ligando (miostatina), origina que cada monómero se una a un receptor tipo II, dando como resultado la formación de un complejo receptor heterotetramérico (Shi *et al.*, 2003). La formación de este complejo conduce rápidamente a la fosforilación del receptor tipo I, catalizada por el dominio cinasa del receptor ActRIIB, como se muestra en la Figura 5a (Miyazawa *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Rebbapragada *et al.*, 2003).

Una vez que el receptor tipo I es activado, este fosforila a las proteínas de la familia de factores de transcripción Smad, en particular las Smads 2 y 3; las Smads son proteínas citoplasmáticas que en estado basal se asocian en homo-oligómeros y permanecen inactivas hasta que son fosforiladas en sus residuos de serina (motivo Ser-X-Ser) del dominio carboxilo-terminal (Massagué *et al.*, 2005). La fosforilación de las proteínas Smads 2 y 3 aumenta su afinidad por la proteína co-Smad (Smad-4) (Figura 5b). El complejo formado por la asociación de estas proteínas se traslada al núcleo donde actúa activando o inactivando la transcripción de diversos genes al interactuar con diferentes cofactores de unión al ADN (como el factor de transcripción FoxO) (Figura 5c) (Massagué y Wotton, 2000; Massagué *et al.*, 2005; Gomis *et al.*, 2006).

1.3.2.1 Función de la miostatina en la proliferación de mioblastos.

Estudios recientes indican que durante la miogénesis, la miostatina regula el número de fibras musculares controlando la proliferación y la diferenciación de mioblastos, mientras que en el desarrollo posnatal regula la activación de células satélite, controlando el crecimiento del músculo esquelético (McCroskery *et al.*, 2003; Kristel *et al.*, 2008; Langley *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2001).

Mediante el análisis del ciclo celular se ha revelado que la miostatina causa la acumulación de mioblastos en la fase G0/G1 del ciclo celular, reduciendo el número

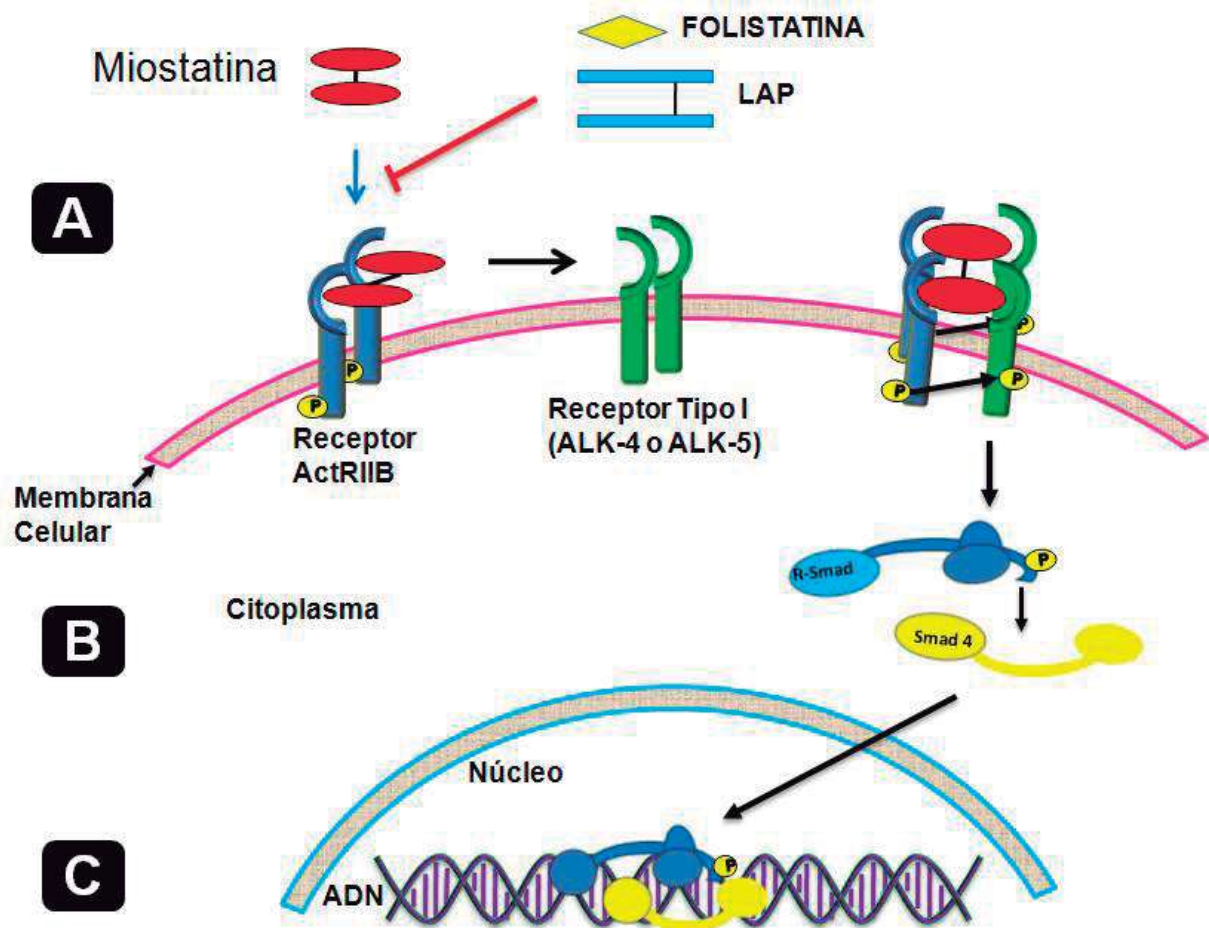


Figura 5. Vía de señalización de la proteína miostatina. La miostatina se une al receptor ActRIIB induciendo la unión de este con el receptor tipo I. Este receptor fosforila a la R-Smad aumentando la afinidad por la proteína Smad4, induciendo su asociación. Este complejo se traslada al núcleo donde actúa activando la transcripción de genes involucrados en la miogénesis.

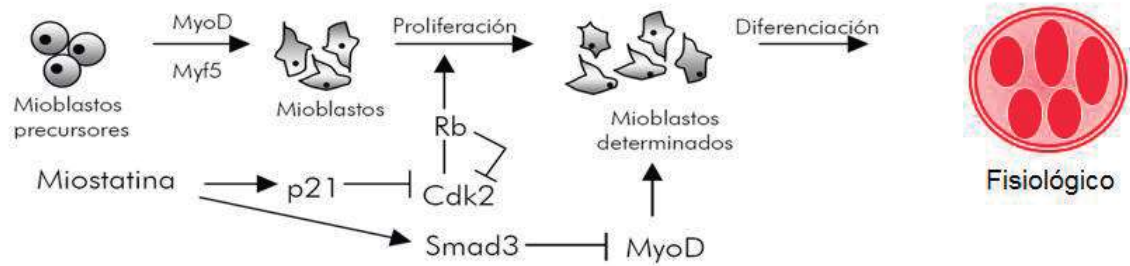
de células musculares en la fase S (Thomas *et al.*, 2000; Joulia *et al.*, 2003). Por lo tanto, la miostatina actúa como un regulador negativo de la progresión en el ciclo celular de los mioblastos (inhibiendo la progresión de la fase G1 a la fase S), manteniendo en estado quiescente a los mioblastos (McCroskery *et al.*, 2003). La progresión de las células a través del ciclo celular es controlada predominantemente por las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las ciclinas asociadas y los inhibidores de las CDKs (CKIs). Thomas *et al.*, (2000) reportaron que el arresto en la progresión del ciclo celular por miostatina está mediada por el incremento en la expresión del CKIs p21 y la disminución de la expresión de Cdk2. Esto último provoca, a su vez, una disminución en la asociación con la ciclina-E, así como una disminución en la fosforilación de Rb (producto del gen susceptible a retinoblastoma) que normalmente actúa uniéndose y reprimiendo la actividad de factores de transcripción específicos, como E2F (Cheng *et al.*, 2000). Estos eventos inhiben la proliferación de mioblastos deteniendo el crecimiento muscular, así como la formación y diferenciación de miotubos (Figura 6a) (Thomas *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001; Joulia *et al.*, 2003). Por el contrario, la inhibición de la síntesis de miostatina lleva a la disminución en los niveles de expresión del gen de p21 e incrementa la proliferación de mioblastos (Figura 6b) (Joulia *et al.*, 2003).

1.3.2.2 Función de la miostatina en la diferenciación de mioblastos.

En la diferenciación miogénica, los mioblastos entran en la fase de arresto del ciclo celular G0/G1 en la que MyoD y/o Myf-5 se reactivan y actúan en la determinación de estas células (Kitzmann *et al.*, 1998). Asimismo, se activa la expresión de la miogenina, que está involucrada en la diferenciación de los mioblastos (Kitzmann y Fernandez, 2001). Por último se expresa MRF4, que interviene en la maduración de los miotubos e igualmente aparecen los factores potenciadores miogénicos (MEF-2), que amplifican la acción de los factores de transcripción MyoD, MyF5, miogenina y MRF4 (Molkentin y Olson, 1996). Todo esto marca la entrada irreversible en la etapa de diferenciación (Yun y Wold, 1996).

Numerosos estudios han demostrado que la miostatina regula negativamente la diferenciación de los mioblastos. Langley *et al.*, (2002) demostraron en cultivo de

A. Con miostatina funcional



B. Sin miostatina funcional

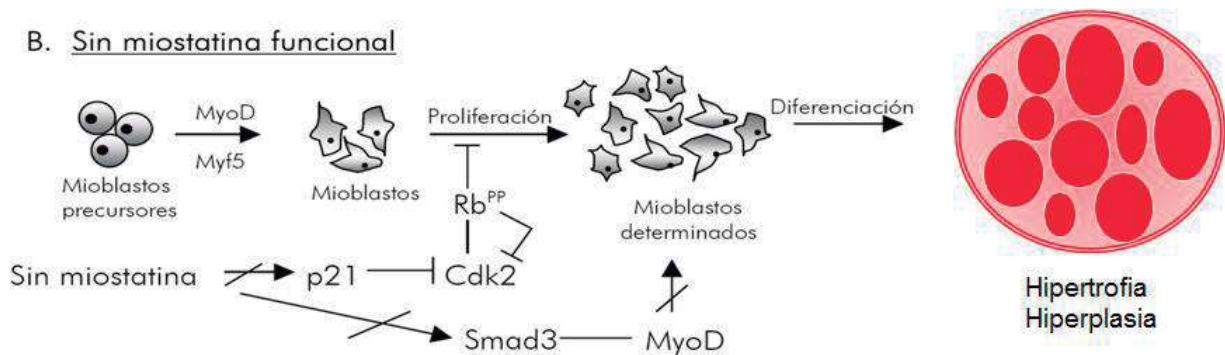


Figura 6. Función de la miostatina en el crecimiento del músculo esquelético. A) La proliferación de los mioblastos es regulado por miostatina vía la regulación positiva de p21 y la inactivación de la actividad de Cdk2, lo que induce la desfosforilación de Rb y la interrupción del ciclo celular. B) Por otro lado la miostatina regula la expresión de MyoD vía Smad3 regulando así la diferenciación. Modificado de Thomas *et al.*, 2000.

mioblastos, que concentraciones altas de miostatina pueden bloquear de forma reversible la diferenciación de mioblastos y que esto es el resultado de la represión de la expresión de los factores de transcripción MyoD, Myf5, miogenina y la sobreexpresión de p21. En el mismo sentido, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de la miostatina en mioblastos también está asociada con la supresión de la formación de miotubos y de fibras musculares, que al igual que la diferenciación de mioblastos, están relacionadas con una disminución en los niveles de las proteínas MyoD y miogenina, y la expresión de p21 (Kitzmann y Fernández, 2001; Guo *et al.*, 1995; Joulia *et al.*, 2003; Ríos *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha visto que durante la diferenciación de mioblastos existe un decremento en la expresión de la proteína miostatina (Deveaux *et al.*, 2003).

1.3.2.3 Efecto biológico de la inhibición de la actividad de la proteína miostatina en la masa muscular.

Con el fin de establecer la función biológica de la miostatina en el desarrollo de la masa muscular, se han desarrollado varias estrategias experimentales enfocadas principalmente a la anulación del gen *Mstn* y la inhibición de la actividad de la proteína miostatina. McPherron *et al.*, (1997) fueron los primeros en demostrar la función de la proteína miostatina mediante la generación de ratones mutantes homocigotos para el gen *Mstn*, observando que los ratones mutantes eran significativamente más grandes en comparación a su contraparte silvestre; en este caso la masa muscular se incrementó de dos a tres veces, como resultado principalmente (en un 86%) de la hiperplasia (aumento en el número de fibras musculares) y en menor grado por la hipertrofia de las células musculares, confirmando, de esta manera, que la miostatina actúa como un poderoso regulador negativo del crecimiento muscular.

En un estudio más reciente, Lee y McPherron (2001) investigaron posibles inhibidores de la proteína miostatina que podrían promover el crecimiento muscular y encontraron que la sobreexpresión de la folistatina o del LAP, podían inhibir la unión de la miostatina a su receptor ActRIIB, produciéndose un incremento significativo de la masa muscular causado principalmente por una hipertrofia de las fibras

musculares. De acuerdo a sus resultados Lee y McPherron (2001) sugirieron que moléculas que actúen bloqueando la señalización de la miostatina pueden ser agentes terapéuticos potenciales para promover el crecimiento muscular.

Los estudios anteriores sugieren que la supresión total de la miostatina es requerida para producir hiperplasia de las fibras musculares, mientras que la moderada disminución de los niveles de miostatina o el inhibir su actividad parcialmente dará como resultado solamente una hipertrofia de las fibras musculares.

1.3.3 Miostatina en la atrofia muscular.

Varios estudios indican que la proteína miostatina juega un papel importante en la pérdida de masa muscular (atrofia muscular). Por ejemplo, en un estudio con células CHO, diseñadas para sobre-expresar la miostatina, éstas fueron inyectadas en el músculo esquelético de ratones resultando en una atrofia muscular severa (Zimmers *et al.*, 2002). Asimismo, se ha observado que ratones transgénicos que expresan altos niveles de la proteína miostatina en el músculo esquelético, presentan una atrofia muscular de un 18-24% (Reisz *et al.*, 2003). Resultados similares fueron obtenidos por Durieux *et al.*, (2007), que mediante experimentos de electroporación para la incorporación del gen *Mstn*, mostraron que la sobreexpresión de la miostatina en músculo esquelético adulto induce un cierto grado de atrofia muscular (20%) sin provocar cambios en el número de fibras musculares. Similarmente, niveles altos de la proteína miostatina se han reportado en la atrofia muscular presentada en algunas enfermedades y durante el envejecimiento. Por ejemplo, un análisis de suero de pacientes infectados con VIH, mostró un incremento en los niveles de la miostatina, al cual se puede atribuir la atrofia muscular asociada con la enfermedad del VIH (Gonzales-Cadavid *et al.*, 1998). Asimismo, estudios realizados en ratas, reportaron que la atrofia muscular asociada con el envejecimiento, correlaciona con la presencia de niveles altos del ARNm de la miostatina en los músculos de las cuádriceps (Mallidis *et al.*, 1999).

Los mecanismos moleculares involucrados en la atrofia muscular inducida por la miostatina, implican la inhibición de la ruta de señalización del factor de crecimiento-1

parecido a la insulina IGF-1/PI3K/AKT (Sandri, 2008). Asimismo, la miostatina disminuye marcadamente la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales del músculo esquelético incluyendo el gen de la cadena pesada de miosina IIb, el de troponina I y el de desmina (Durieux *et al.*, 2007).

1.3.4 Regulación de la expresión del gen *Mstn*.

Los mecanismos de regulación de la expresión del gen *Mstn* son poco conocidos. Las principales investigaciones al respecto se han enfocado en el estudio y análisis del promotor del gen *Mstn*, específicamente en la búsqueda de secuencias reguladoras conocidas como elementos “cis” o elementos de respuesta (RE).

El promotor del gen *Mstn* se ha analizado y caracterizado en varias especies de vertebrados: humanos (Ma *et al.*, 2001), bovinos (Spiller *et al.*, 2002; Crisa *et al.*, 2003), ovejas (Du *et al.*, 2005) y en peces (Xu *et al.*, 2003). En humanos, el análisis de la secuencia del promotor del gen *Mstn* reveló la presencia de sitios de unión a diferentes factores de transcripción (MEF2, PPAR- γ (receptor con actividad proliferativa peroxisomal- γ), NF- κ B (factor nuclear-KB) y POU (proteína de unión octamérica)), así como un número de sitios correspondientes a secuencias consenso de unión a hormonas (Ma *et al.*, 2001). Las secuencias de unión a hormonas incluyen un elemento de respuesta a andrógenos (ARE), dos elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), tres elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TRE), así como, cinco secuencias correspondientes a elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE).

Al analizar la funcionalidad de los GRE, Ma *et al.*, (2001) demostraron que el glucocorticoide dexametasona aumenta la expresión del gen *Mstn* en cultivo de mioblastos y que en este efecto participa el receptor a glucocorticoides, ya que el efecto de dexametasona podía ser antagonizado por el antagonista de los receptores a glucocorticoides, RU-486. En concordancia con estos resultados, Lang *et al.*, (2001) reportaron que al provocar una lesión térmica en el músculo gastrocnemio de rata, se induce la producción de altas concentraciones de glucocorticoides endógenos, los cuales a su vez incrementan los niveles de ARNm de la miostatina.

Por lo tanto, estos estudios llevaron a los autores a proponer que los glucocorticoides pueden regular positivamente la expresión del gen *Mstn*.

1.4 Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) son un grupo de hormonas que participan en la regulación del metabolismo y la resistencia al estrés. Los GC son producidos y liberados en la corteza suprarrenal por la acción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y los niveles de los GC se encuentran bajo el control del eje hipotalámico-hipofisiario-suprarrenal (Bamberger *et al.*, 1996; Necela y Cidlowski, 2004). Los GC son sintetizados a partir de la molécula del colesterol y están constituidos por 21 átomos de carbono formando una estructura de 4 anillos (Figura 7). La corticosterona y el cortisol (hidrocortisona), son los dos GC endógenos, siendo el cortisol, el principal GC segregado por la corteza suprarrenal humana y el esteroide más abundante en la sangre. Actualmente se cuenta con una gran diversidad de GC sintéticos, en los que se introducen cambios (diferentes grupos sustituyentes) dirigidos a optimizar su potencia glucocorticoide (antiinflamatoria) y la duración del efecto farmacológico (Parker y Schimmer, 1996; Adcock, 2003). Estudios de relación estructura-actividad han mostrado que el doble enlace entre los carbonos 4,5 y el grupo 3-cetona en el anillo A son esenciales para la actividad GC y la antiinflamatoria. La adición de un doble enlace entre los carbonos 1, 2, como en dexametasona, triamcinolona y betametasona, aumenta la actividad glucocorticoide en relación a la mineralocorticoide. En el anillo B, la adición de un grupo 9- α Fluor aumenta la actividad biológica, tanto GC como mineralocorticoide. En el anillo C, el grupo 11-hidroxilo es esencial para la actividad GC y antiinflamatoria pero no para el efecto mineralocorticoide. En el anillo D, la adición de un grupo 16-metilo, casi elimina la actividad mineralocorticoide; cuando se combina la adición del doble enlace 1,2 en el anillo A, el grupo 9- α Fluor y otras sustituciones en el carbono 16 del anillo D, como en dexametasona, triamcinolona y betametasona, la actividad GC aumenta notoriamente (Schimmer y Parker, 1996). Lo anterior indica la importancia de la estructura de los GC para modular su efecto farmacológico (potencia antiinflamatoria), así como su perfil glucocorticoide/mineralocorticoide.

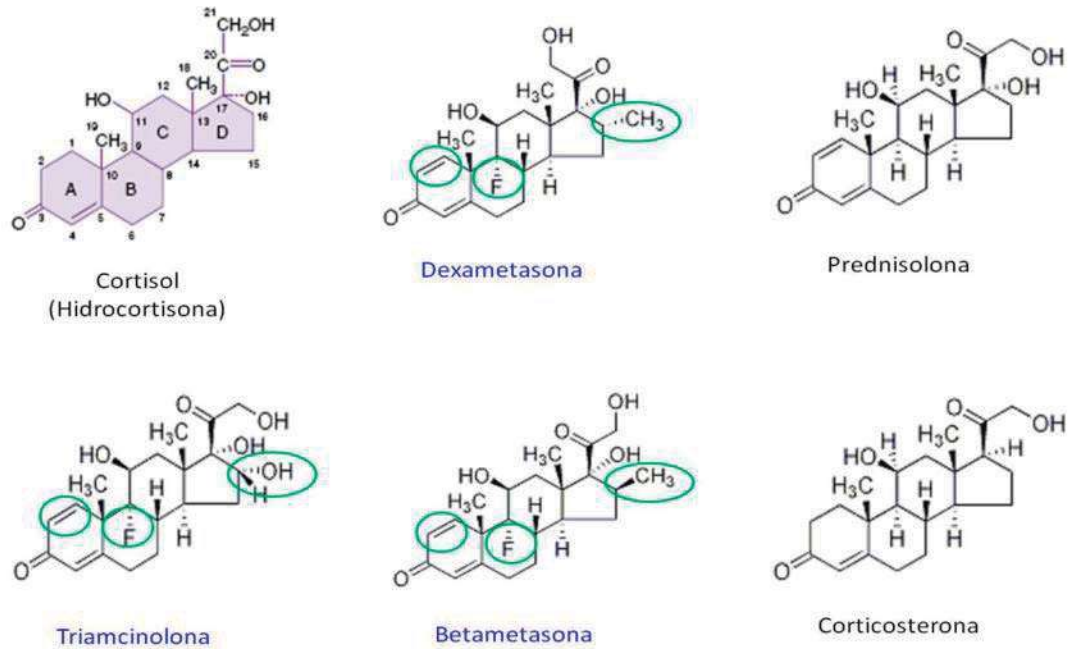


Figura 7. Estructura molecular de los glucocorticoides. Derivados a partir del cortisol, su estructura está constituida por 21 carbonos conformando un esqueleto de 4 anillos. Sus diferencias radican en sus grupos sustituyentes en torno a un núcleo estructural común. Los círculos indican estas diferencias con respecto al cortisol.

Los GC participan en numerosos procesos fisiológicos, como la homeostasis de la glucosa, metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos; a diferencia de los mineralocorticoides que están implicados en la regulación del agua y minerales en el organismo (Cosio *et al.*, 2005; Gupta y Lalchandama, 2002). Los GC ejercen un potente efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. La actividad antiinflamatoria de los GC se debe a la interrupción de la ruta mediada por las citocinas, mientras que su efecto inmunosupresor se debe a que también tienen la capacidad de inducir apoptosis en muchas células, incluyendo timocitos, monocitos y células T periféricas (Distelhorst, 2002; Lépine *et al.*, 2004).

Los GC son ampliamente utilizados en la medicina humana y veterinaria, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como el asma, la artritis reumatoide, colitis ulcerosa y alergias, así como la mastitis en bovinos (Necela y Cidlowski, 2004). Los GC son también un componente de muchos regímenes de quimioterapia para el tratamiento de leucemias, linfomas y mielomas, debido a su papel en la inducción de la apoptosis (San Miguel *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso a largo plazo de glucocorticoides se ha visto limitado por sus efectos secundarios ó adversos que van desde la supresión de la producción de GC endógenos, osteoporosis, atrofia muscular, retraso del crecimiento y desarrollo de resistencia a los glucocorticoides (Schäcke *et al.*, 2002; Oviedo-Boyzo *et al.*, 2007). Estos efectos secundarios se producen principalmente a través de la activación de la transcripción de genes, mientras que en el caso de los efectos favorables de los GC (antiinflamatorios) se presentan principalmente por mecanismos de represión de la transcripción de genes que codifican para proteínas pro-inflamatorias (Cosio *et al.*, 2005; Gupta y Lalchandama, 2002).

Para lograr los efectos antes mencionados, los GC (por su naturaleza lipídica) atraviesan la membrana plasmática y son reconocidos por los receptores de GC de tipo alfa (α GR) que se encuentran en el citoplasma de la célula. En la ausencia de hormona los α GR se asocian a las proteínas de choque térmico Hsp-70 y las Hsp-90, así como a la inmunofilina p59 y la fosfoproteína p23, lo que previene la translocación de los α GR hacia el interior del núcleo (Pratt y Toft, 1997). La proteína de choque térmico Hsp-90 mantiene la conformación espacial apropiada del α GR

requerida para la unión del ligando. La unión de los GC al receptor α GR citoplásmico induce la liberación de la proteína Hsp-90, lo que resulta en un cambio conformacional que marca la señal para que el complejo α GR-GC se transloque al núcleo (Necela y Cidlowski, 2004). Una vez en el núcleo, el complejo α GR-GC actúa a través de varios mecanismos de acción, para activar, suprimir o inhibir la transcripción de genes mediante la unión a los elementos de respuesta GRE (así como a los AP-1) localizados en el promotor de los genes diana (Figura 8).

La inhibición o represión de la expresión de genes por los GC, involucra tres posibles mecanismos: el α GR activado por los GC, se traslada al núcleo y se une a elementos de respuesta a glucocorticoides negativos (nGRE) inhibiendo la transcripción de genes como POMC y osteocalcina (Gupta *et al.*, 2003); otro mecanismo posible es que una vez que el α GR se ha activado, éste se traslada al núcleo, donde se une a las subunidades c-Jun y c-Fos del complejo AP-1 e inhibe la expresión de genes; una tercera posibilidad es que un vez activado el receptor α GR, este se dimerice con un receptor a GC tipo beta (β GR), se traslade al núcleo e interaccione con sitios GRE para inhibir la transcripción de genes (Gupta *et al.*, 2003).

Por otra parte, la activación de la expresión de genes por los GC, involucra la activación y posterior dimerización de dos receptores α GR, así como su subsecuente translocación al núcleo y la unión a secuencias GRE para estimular la transcripción de genes (Necela y Cidlowski, 2004). Este último mecanismo es muy importante ya que como se mencionó anteriormente, varios de los efectos secundarios de los glucocorticoides son producidos principalmente a través de la activación de la transcripción de genes. Por ejemplo, en el caso particular de la atrofia muscular inducida por el tratamiento con GC, tenemos que se activa la expresión de genes como el factor de transcripción FoxO, el cual a su vez activa la expresión de atrogenes, como atrogina-1 y MuRF1 que participan en la proteólisis del músculo esquelético (Trendelenburg *et al.*, 2009; McFarlane *et al.*, 2006). Asimismo, también se activa la expresión del gen *Mstn* que, como se mencionó anteriormente, tiene un papel relevante en la regulación del crecimiento muscular (Ma *et al.*, 2001).

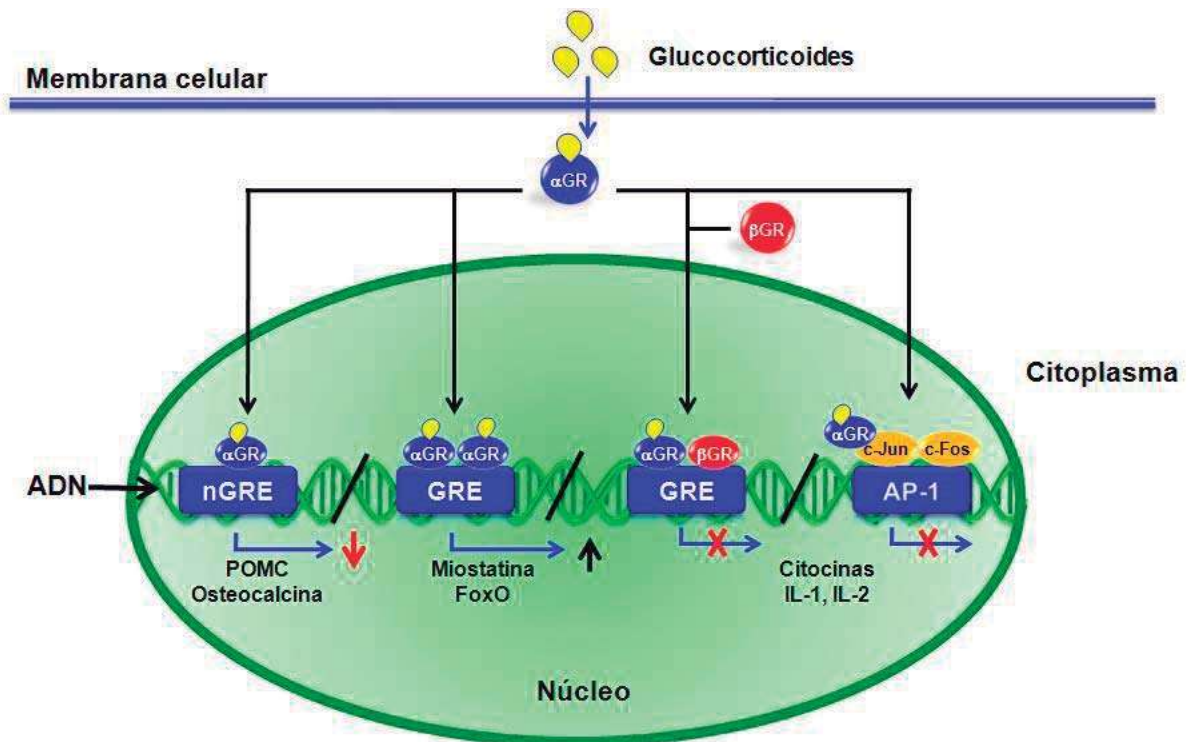


Figura 8. Mecanismos de acción de los glucocorticoides. Los glucocorticoides atraviesan la membrana plasmática de las células blanco, en el citoplasma son reconocidos por los receptores a glucocorticoides-alfa α GR y se internan al núcleo para regular la expresión de genes a través de elementos de respuesta contenidos en la región promotora de genes diana. De izquierda a derecha: EL α GR activado se puede unir a elementos de respuesta a GC negativos (nGRE) e inhibe la transcripción de genes (osteocalcina); El α GR se puede unir como un homodímero a elementos de respuesta a GC (GRE) de genes diana para activar la transcripción (Miostatina y FoxO); El α GR se puede formar un heterodímero con el receptor β GR y unirse a secuencias GRE para inhibir la transcripción de genes (citocinas e interleucinas); La interacción física de los α GR con las subunidades c-Jun y c-Fos del complejo AP-1 con los elementos de respuesta AP-1, inhiben la transcripción de genes (interleucina-1). Modificado y adaptado de Necela y Cidlowski, 2004.

1.4.1 Atrofia muscular inducida por glucocorticoides.

La atrofia muscular es uno de los efectos colaterales más importantes reportados en el uso terapéutico de los GC. Además, es bien conocido el efecto catabólico de los GC que se presenta en varias patologías que cursan con un aumento en los niveles de glucocorticoides endógenos circulantes, como son: sepsis, caquexia, hambre, acidosis metabólica, insulinopenias graves, etc (Lecker *et al.*, 1999).

La atrofia muscular inducida por glucocorticoides afectan principalmente a las fibras musculares de tipo II o de contracción rápida (músculo gastronecmio, plantar), con menor o ningún efecto observado en las fibras de tipo I (el sóleo) (Gosker *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003).

Varios estudios indican que la atrofia muscular inducida por GC es mediada, de manera importante, por un aumento en los niveles de expresión de miostatina. En un estudio realizado por Ma *et al.*, (2003) se observó que la administración del glucocorticoide dexametasona en ratas provoca atrofia muscular así como un aumento en los niveles de expresión de miostatina. Por otra parte, en un estudio más reciente Durieux *et al.*, (2007) se encontró que la sobreexpresión de la miostatina en el músculo esquelético provoca una disminución de la masa muscular de un 20%. Finalmente, en un estudio *in vivo* usando un modelo de ratones knock-out (KO) para miostatina se observó que, en contraste con los ratones silvestres, los ratones KO para miostatina no desarrollaron atrofia muscular después del tratamiento con dexametasona (Gilson *et al.*, 2007).

Los mecanismos moleculares implicados en la atrofia muscular inducida por los GC, involucran una disminución en la velocidad de síntesis de proteínas y un aumento en la tasa de degradación de proteínas (Lofberg *et al.*, 2002; Eley y Tisdale, 2007). Los efectos inhibitorios de los GC sobre la síntesis de proteínas se deben a que bloquean el transporte de aminoácidos hacia el interior de las células musculares e inhiben la ruta de señalización IGF-1/PI3K/Akt (Schakman *et al.*, 2008). Esta inhibición se debe a que los GC inducen la expresión de la miostatina, que a su vez disminuye la fosforilación de Akt (proteína kinasa B) evitando la activación mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos, por sus siglas en inglés) (Amirouche *et al.*, 2009;

Morissette *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2000; Southgate *et al.*, 2007; Trendelenburg *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006). La inhibición de la actividad de mTOR, ocasiona una disminución de la fosforilación de la proteína de unión a eIF4E (4E-BP1) y la proteína ribosomal cinasa S6 (S6K1), dos factores que juegan un papel clave en la síntesis de proteínas (Liu *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2000).

Asimismo, los efectos de los GC en la estimulación de la proteólisis en el músculo esquelético se deben en buena parte a la inducción de la expresión de la miostatina. En este caso, la proteína miostatina, a su vez, aumenta los niveles del factor de transcripción FoxO (particularmente los factores FoxO-1 y FoxO-3), que incrementa la expresión de genes asociados con la atrofia muscular (atrogenes) como son: ubiquitina (E2), ubiquitina-ligasa (E3), atrogina-1, MuRF1 y catepsina L (Almon *et al.*, 2007; Imae *et al.*, 2003; Lecker *et al.*, 2004; Satchek *et al.*, 2007). Finalmente, este incremento en la expresión de atrogenes activa los principales sistemas proteolíticos de la célula: el sistema proteosoma-ubiquitina (UPS), el sistema lisosomal (catepsinas) y el sistema dependiente de calcio (calpainas) (Hasselgren, 1999; Mitch and Goldberg, 1996; McFarlane *et al.*, 2006; Seiffert *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

El músculo esquelético es el tejido más abundante en vertebrados y es el encargado de producir el movimiento y mantener la postura del cuerpo. El músculo esquelético tiene un amplio potencial adaptativo (morfológico y metabólico), esto significa que es capaz de modificar su estructura en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y patológicas, experimentando una ganancia o pérdida de peso significativa.

La pérdida de peso o atrofia muscular es uno de los principales efectos adversos del uso terapéutico de los GC, que también está presente en muchas patologías (sepsis, caquexia, hambre, acidosis metabólica, insulinopenias graves, VIH, etc.) en las que se ha asociado con un aumento en los niveles de glucocorticoides endógenos circulantes, así como a un aumento en los niveles de expresión del gen *Mstn*. Antecedentes muestran que el gen *Mstn* humano presenta en su región promotora cinco elementos GRE activos, ya que se probó que la dexametasona incrementaba la expresión del gen *Mstn*, sugiriendo que la miostatina media la atrofia muscular inducida por glucocorticoides. Por otra parte, en un estudio en células de epitelio mamario bovino, se observó que la expresión del gen *Mstn* varía dependiendo del tipo (estructura) del GC empleado, encontrándose que unos GC (como dexametasona, prednisolona e hidrocortisona) aumentaron la expresión del gen *Mstn*, otros (como triamcinolona) no produjeron cambios en los niveles de expresión, mientras que algunos como betametasona inhibieron la expresión del gen *Mstn*. Lo que implica que si los GC modulan de manera diferencial la expresión del gen *Mstn*, podrán inducir también diferentes grados de atrofia muscular. Por lo anterior es importante determinar el efecto de otros GC diferentes a dexametasona tienen sobre la expresión del gen *Mstn* y sus efectos sobre músculo esquelético.

3. HIPÓTESIS

Los glucocorticoides regulan de manera diferente la expresión del gen *Mstn* en músculo esquelético de rata y producen diferentes grados de atrofia muscular.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Evaluar los cambios musculares inducidos por glucocorticoides (dexametasona, triamcinolona y betametasona) y su relación con los niveles de expresión del gen *Mstn* en músculo esquelético de ratas.

4.2 Objetivos particulares.

- a) Evaluar los cambios musculares producidos por glucocorticoides.

- b) Determinar los niveles de expresión del gen *Mstn* inducida por glucocorticoides.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales.

Se utilizaron ratas macho de 8-9 semanas de edad y un peso de 190-220 gr, de la cepa Wistar. Cada animal fue alojado individualmente en cajas de policarbonato en condiciones ambientales controladas, a 25°C, con un periodo luz/oscuridad de 12:12 horas y acceso libre a comida (Teklan®, 18% proteína) y agua. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos de 6 ratas cada uno: control, tratamiento con dexametasona, tratamiento con triamcinolona y tratamiento con betametasona.

5.2 Administración de glucocorticoides.

La dexametasona, triamcinolona y betametasona fueron diluidas en 500 µl de solución salina (0.9% NaCl) y se administraron diariamente mediante inyecciones vía intraperitoneal a dosis equimolares (1.53 µM/kg de peso corporal) por 5 días. Esta dosis fue seleccionada con base en reportes previos que muestran que la administración de dexametasona a 1.53 µM/kg de peso corporal (600 µg/kg de peso corporal) causa atrofia significativa del músculo esquelético (Goodlad y Clark, 1991; Savary *et al.*, 1998). Los animales control recibieron inyecciones de un volumen igual de solución salina.

Durante el periodo de tratamiento las ratas fueron pesadas diariamente. Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (Marshall *et al.*, 1994). Los músculos gastrocnemios de ambas piernas fueron disectados, pesados, congelados rápidamente y almacenados a -70 °C para su posterior análisis (ver Figura 9).

5.3 Análisis histológico del músculo esquelético.

5.3.1 Obtención de los cortes histológicos del músculo gastrocnemio.

Para el análisis histológico, el músculo gastrocnemio obtenido de la pierna derecha fue pesado y congelado inmediatamente en hexano enfriado con nitrógeno líquido

(Filho *et al.*, 2006). El músculo gastrocnemio fue dividido en dos partes mediante un corte transversal en el centro del músculo y fijado en medio de inclusión (Tissue Tek). Para el análisis histológico, se hizo un corte transversal de la parte media de cada músculo (12 μ m de espesor) mediante el empleo de un criostato (Leica, modelo-CM1510 S) a -20°C . Los cortes fueron fijados en portaobjetos a 100°C durante 15 segundos.

5.3.2 Tinción con hematoxilina y eosina.

Para evaluar los cambios morfológicos del músculo gastrocnemio, las secciones transversales fueron teñidas con hematoxilina y eosina (McManus y Mowry, 1960). Este es un método histológico que resalta la morfología de las células y tejidos. Para la tinción histológica, las secciones transversales del músculo gastrocnemio fueron sumergidas en una serie de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (alcohol absoluto, 95° , 70° y 50° , durante 2 minutos en cada caso). A continuación, los cortes de músculo se hidrataron con agua destilada durante 30 segundos y se sumergieron en hematoxilina durante 5 minutos. Para eliminar el exceso de colorante, los cortes se lavaron durante 30 segundos en agua destilada. Posteriormente, los cortes de músculo fueron sumergidos por 1 minuto en agua amoniacal para aumentar la fijación del colorante en los núcleos y, subsecuentemente, se colocaron durante 15 segundos en una solución alcohol acida (0.25% de HCl) para eliminar los restos de colorante (hematoxilina) que no se unieron al núcleo. Después se lavaron durante 1 minuto en alcohol (70°) y se sumergieron durante 3 minutos en solución alcohólica de eosina. Los cortes de músculo gastrocnemio se deshidrataron pasándolas en una serie de soluciones alcohólicas de concentración creciente (70° , 80° , 95° y alcohol absoluto, durante 2 minutos en cada caso) y por último se sumergieron en xilol durante 15 minutos. Finalmente, los cortes de músculo esquelético teñidos se cubrieron con medio de montaje, a base de tolueno (DPX, Panreac) para facilitar la visualización por microscopio. Con la tinción de hematoxilina y eosina los núcleos en el sarcolema son teñidos de azul, las fibras musculares de rosa y el tejido conectivo de rosa claro.

5.3.3 Análisis morfométrico de los cortes histológicos.

Los cortes transversales de músculo teñidos fueron visualizados con un microscopio vertical (Carl Zeiss), usando el objetivo 20X. La imagen fue capturada con ayuda de una cámara digital microscópica (Axioncam). De cada sección transversal del músculo gastrocnemio se analizaron aleatoriamente 3 campos, de los cuales se determinó el número de fibras musculares y el área de cada fibra muscular, usando un sistema de análisis de imagen computarizado (software AxioVision Release 4.7) acoplado al microscopio utilizado.

5.4 Análisis de la expresión del gen *Mstn*.

5.4.1 Extracción de ARN total.

El músculo gastrocnemio obtenido de la pierna izquierda de cada rata fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -70 °C. Posteriormente se tomaron muestras de cada músculo (50 mg) y se extrajo el ARN total utilizando el reactivo de TRIzol® (Invitrogen), el cual es una mejora de un solo paso de la extracción de ARN del método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). La muestra de tejido muscular se homogenizaron utilizando 1 ml del reactivo de TRIzol®; el cual mantiene la integridad del ARN, mientras las células son lisadas y disueltos los componentes celulares. Luego de la digestión del tejido, se adicionaron 200 µl de cloroformo, se homogenizó durante 15 segundos utilizando un vortex, se incubó por 3 minutos a 4°C e inmediatamente se centrifugó a 11,500 rpm por 15 segundos, lo que resultó en una separación de la solución en una fase acuosa y una fase orgánica. La fase acuosa fue recupera, ya que el ARN permanece exclusivamente en ella. A partir de esta fase se precipitó el ARN con isopropanol (0.5 ml) durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó por 10 minutos a 11,500 rpm y se decantó el sobrenadante; en este punto, el ARN aparece como un precipitado blanquecino o *pellet* en el fondo del tubo. Posteriormente se lavó el pellet de ARN con 1 ml de etanol al 75%, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 7,500 rpm y se decantó nuevamente el sobrenadante. Tras dejar evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente, se

resuspendió el ARN total en 50 µl de agua estéril y desionizada (libre de ARNsas). Finalmente se determinó la concentración de ARN de las diferentes muestras midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman, modelo- DU 700 UV-VIS) a una longitud de onda de 260 nm.

5.4.2 Síntesis de ADN complementario.

Una vez obtenido el ARN total de cada músculo gastrocnemio, se realizó la síntesis del ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (RT) a partir de 1 µg del ARN total. Para cada reacción de RT, se utilizó 1 µl de OligodT (25 µg/ml) como cebador (*primer*), 0.5 µl de RNasin (20 U/µl) como inhibidor de ARNasa, 1 µl de dNTPs (10 µM), 4 µl solución buffer (5X) y 0.5 µl de enzima del kit de transcriptasa reversal M-MLV (20 U/ µl); los tres primeros reactivos fueron obtenidos de Invitrogen, en tanto que el kit de transcriptasa reversa fue obtenidos de Roche. La reacción se aforó a un volumen final de 20µl con agua estéril y desionizada, y se dejó durante 10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se llevó al termociclador (PCR System 2700, Applied Biosystem Gen Amp®) utilizando el siguiente programa: 40 °C/50min (fase de síntesis de los ADNc), 94 °C/4min y 6 °C/4 min. Terminado el programa el ADNc sintetizado se almacenó a -20 °C, para su posterior análisis.

5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

A partir del ADNc sintetizado por RT, se amplificó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el gen *Mstn* que codifica para la proteína miostatina y el gen β -actina, que se utilizó como gen de referencia. Para esta técnica se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada gen. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas para el gen *Mstn* fueron: oligonucleótido sentido MYO5 5'-CAT GCA AAA ACT GCA AAT CTC-3' y oligonucleótido antisentido MYO3 5'-TCA TGA GCA CCC ACA GCG-3'. Para el gen β -actina los oligonucleótidos que se utilizaron fueron: oligonucleótido sentido β -act5 5'-ATG GTG GGA ATG GGT CAG AA-3' y oligonucleótido antisentido β -act3 5'-TCG

TAC TCC TGC TTG CTG A-3'. La mezcla de reacción para la amplificación se aforó con agua desionizada a un volumen final de 50 µl utilizando los reactivos y cantidades especificados en la Tabla 2.1.

Tabla 1 Reactivos y volumen utilizados en la reacción de PCR.

<u>Reactivo</u>	<u>[STOCK]</u>	<u>Volumen de reacción</u>	<u>[Reacción]</u>
Buffer libre de Mg ⁺⁺ (invitrogen)	10X	5 µl	1X
MgCl ₂ (invitrogen)	25mM	4 µl	2 mM
dNTP's (invitrogen)	2mM	5 µl	200 nM
Oligonucleótido 5'	100 pmol/ µl	1 µl	2 pmol
Oligonucleotido 3'	100 pmol/ µl	1 µl	2 pmol
Taq (invitrogen)	5U/ µl	0.5 µl	2.5 U
ADNc		1 µl	
H ₂ O		32.5 µl	

Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas para las reacciones de PCR fueron: un primer ciclo de 1 minuto a 94°C, seguido de 45 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización: 30 segundos a 94°C; fase de hibridación de oligonucleótidos: 90 segundos a 54°C; fase de extensión: 90 segundos a 72°C). La reacción finaliza con un ciclo de 10 minutos a 72°C y 4 minutos a 6°C. La temperatura de alineación o hibridación de los oligonucleótidos, se determinó mediante un gradiente de temperatura (50°, 52°, 54°, 56° y 58° C). Como control negativo en la amplificación del gen *Mstn* se utilizó el ARN total extraído de las muestras de músculo.

5.4.4 PCR en tiempo real.

A partir de las muestras congelada de músculo gastrocnemio, se extrajo el ARN total siguiendo el protocolo comercial del TRIzol® (como ya se ha descrito) y se sintetizó el ADNc. Una vez obtenido el ADNc, se cuantificaron los niveles de expresión génica del gen *Mstn* mediante la técnica de la PCR en tiempo real (PCR-TR) utilizando el kit

comercial denominado Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Este kit se basa en el uso de intercaladores de ADN como el fluoróforo (SYBR[®] Green), el cual se intercala en las cadenas dobles de ADN que se están sintetizando y emite fluorescencia al ser excitado por una luz emitida por un equipo acoplado al termociclador. De tal forma que existe una relación directa, al generarse la amplificación del ADN, entre la cantidad de fluorescencia y número de copias de ADN (Zipper *et al.*, 2004). Para determinar los niveles de expresión del gen de interés se debe utilizar un gen de referencia (*House Keeping*) cuya expresión no se altere con el tratamiento utilizado en el experimento, regularmente se usa un gen constitutivo. En este estudio se utilizó el gen constitutivo β -actina, que de acuerdo con reportes en la literatura no modifica su expresión con los tratamientos (Zipper *et al.*, 2004; Costa, 2004). En la técnica de PCR-TR, se recomienda la amplificación de fragmentos no mayores a 200 pb. Por lo anterior se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificación de los genes de interés. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas para el gen *Mstn* fueron: oligonucleótido sentido TRMYO5 5'-AAG ACT CCT ACA ACA G-3' y oligonucleótido antisentido TRMYO3 5'-GTC TTC ACA TCA ATA C-3'. Para el gen β -actina los oligonucleótidos que se utilizaron fueron: oligonucleótido sentido TRACT5 5'- ACT GTG CCC ATC TAT G -3' y oligonucleótido antisentido TRACT3 5'-AAC ATA GCA CAG CTT C-3'. Para el gen *Mstn* los oligonucleótidos utilizados amplificaron un fragmento de 144 pb y para el gen β -actina un fragmento de 174 pb. La temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos se determinó mediante un gradiente de temperatura (50°, 52°, 54° y 56°), seleccionando la temperatura a la cual se observó una banda única para eliminar las posibles interferencias. De los resultados de PCR en tiempo real se realizó inicialmente una curva de calibración (curva estándar) del número de copias del gen de actina que se generan del producto del PCR durante un número de ciclos determinado (C_t). A partir de esta curva estándar se calculó el número de copias del gen de estudio (*Mstn*). La PCR fue realizada en el aparato Roto-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). Las reacciones fueron realizadas con 1 μ l de ADNc como molde, 6 μ l qPCR SuperMix-UDG (Invitrogene), 1 μ l de cada uno de los oligonucleotidos (10 pmol), 1 μ l de ROX (fluoróforo) y 2 μ l de agua (estéril-

desionizada) para un volumen final de 12 μ l para cada reacción. Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas para las reacciones de PCR fueron: un primer ciclo de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización: 10 segundos a 95°C; fase de hibridación de oligonucleótidos: 45 segundos a 52°C; fase de extensión: 20 segundos a 72°C). La reacción finaliza con un ciclo de 6 minutos a 72°C y 4 minutos a 6°C. La expresión del gen se calculó usando el método Dcycle threshold (Dct), el cual es realizado de manera automática por el software del termociclador para determinar el umbral de amplificación y normalizado para el contenido de β -actina. Los resultados se expresaron como el cociente del nivel de expresión del gen de estudio (*Mstn*) entre el nivel de expresión del gen de referencia (β -actina).

5.5 Electroforesis en gel de agarosa.

5.5.1 Electroforesis del ARN.

El ARN total fue separado por electroforesis usando geles de agarosa. Los cuales contenían agarosa al 1% (Invitrogen) y solución Tris/borato/EDTA (TBE) 1X. Un volumen de 1 μ g de ARN total fue mezclado con un volumen apropiado de buffer de carga (solución de azul de bromofenol) y se aforó a 10 μ l con agua destilada. Como buffer de corrida se utilizó solución TBE 0.5X. Para teñir el ARN, al buffer de corrida se le agregaron 5 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 10 ng/ml. Tras la carga de ARN, la electroforesis se corrió a 130 V en buffer TBE 0.5X durante 30 minutos. El gel resultante fue observado posteriormente bajo luz ultravioleta y fotografiado con un equipo Eagle Eye II (Stratford) para evaluar la integridad del ARN de acuerdo a las bandas ribosomales (28S, 18S y 5S).

5.5.2 Electroforesis del DNA.

Dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN amplificados por PCR y PCR en tiempo real se usaron geles de agarosa conteniendo 0.8 o 1.5% de agarosa, respectivamente y solución TBE 1X. El producto de las PCR se mezcló con un

volumen apropiado de buffer de carga (solución de azul de bromofenol). Como buffer de corrida se utilizó solución TBE 0.5X. Para teñir el ADN, al buffer de corrida se le agregaron 5 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 10 ng/ml. Tras la carga del ADN, la electroforesis se corrió a 130 V durante 30 minutos para los productos de amplificación por PCR tradicional del gen *Mstn* y el gen β -actina. En el caso de los fragmentos amplificados para la PCR en tiempo real, la electroforesis se corrió a 100 V durante 50 minutos. Los geles resultantes fueron observados posteriormente bajo luz ultravioleta y fotografiados con un equipo Eagle Eye II (Stratford) para su análisis.

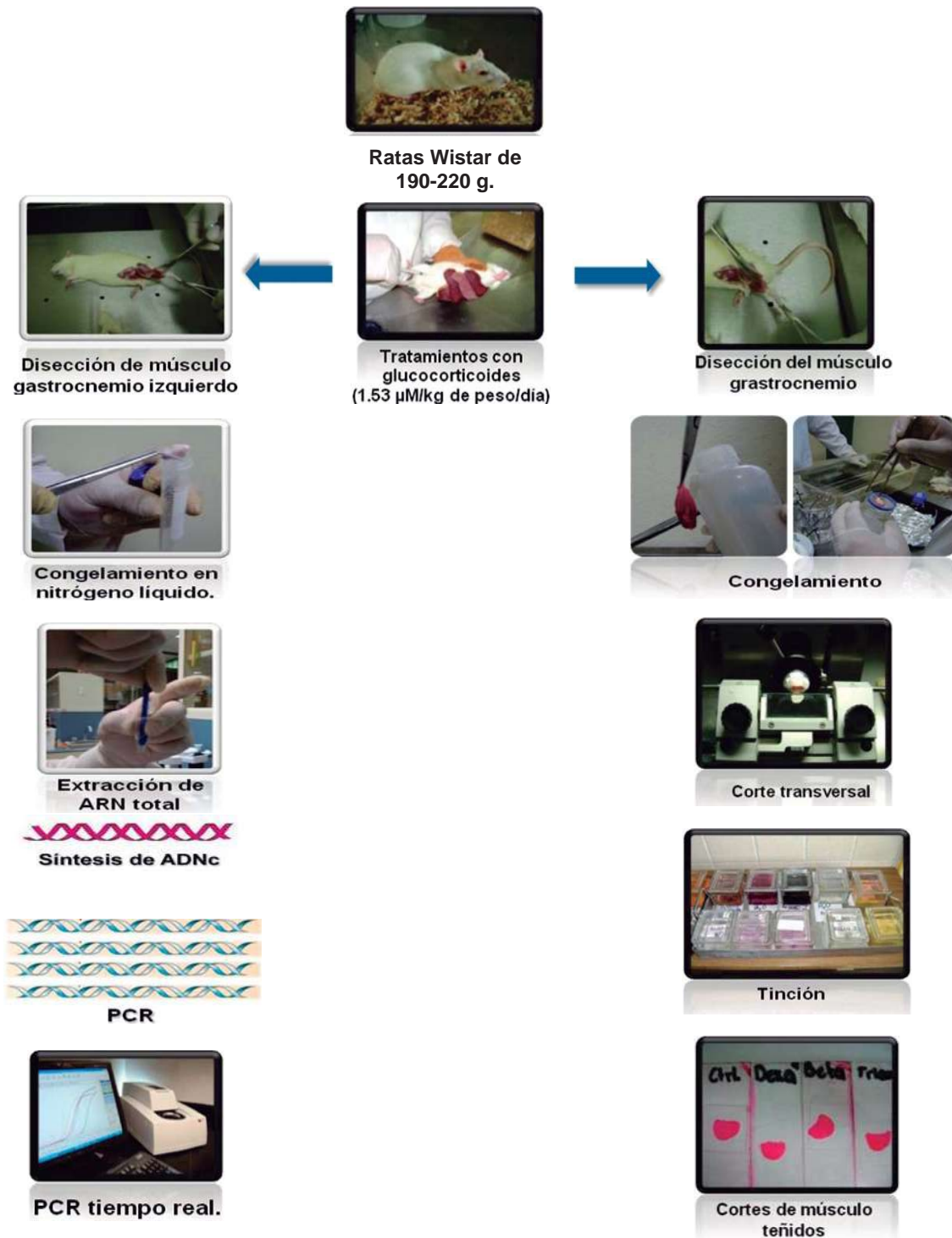


Figura 9. Diagrama de flujo de la estrategia experimental. Metodología para el análisis de los cambios en las fibras del músculo esquelético inducidos por glucocorticoides y su relación con los niveles de expresión del gen *Mstn* en ratas.

6. RESULTADOS

6.1 Cambios en el peso corporal de las ratas durante el tratamiento con dexametasona, triamcinolona o betametasona.

Los valores obtenidos del peso corporal de las ratas tratadas y del grupo control son expresados en términos de la variación del peso corporal con respecto al peso de los animales al día cero y son presentados en la Figura 10. En esta figura se puede observar que el promedio de la variación del peso corporal de las ratas del grupo control aumenta diariamente durante todo el tratamiento, siendo este aumento significativo desde el primer día. Asimismo, los grupos de ratas tratadas con triamcinolona y betametasona presentaron un perfil de ganancia de peso corporal semejante al del grupo control. Por el contrario, el grupo de ratas tratadas con dexametasona presentaron una disminución del peso corporal, siendo esta significativa desde el primer día de tratamiento.

6.2 Efectos de dexametasona, triamcinolona o betametasona sobre el peso del músculo gastrocnemio.

Al finalizar el tratamiento con GC se disectó el músculo gastrocnemio (que está formado principalmente por fibras de contracción rápida) de las ratas tratadas y control, con el objeto de evaluar los efectos de los GC sobre la pérdida de masa muscular. Para este fin, se determinó el peso del músculo gastrocnemio derecho de cada rata y en la Figura 11 se presentan los promedios de cada grupo. Al hacer la comparación del peso promedio de los músculos de las ratas tratadas con los de las ratas del grupo control, se observó que el peso del músculo gastrocnemio de las ratas tratadas con dexametasona y triamcinolona presentaron una pérdida de masa muscular, siendo este efecto más marcado en las ratas que recibieron el tratamiento con dexametasona. En relación al tratamiento con betametasona, se observó que este no ejerció un cambio significativo en el peso del músculo gastrocnemio en comparación al grupo control.

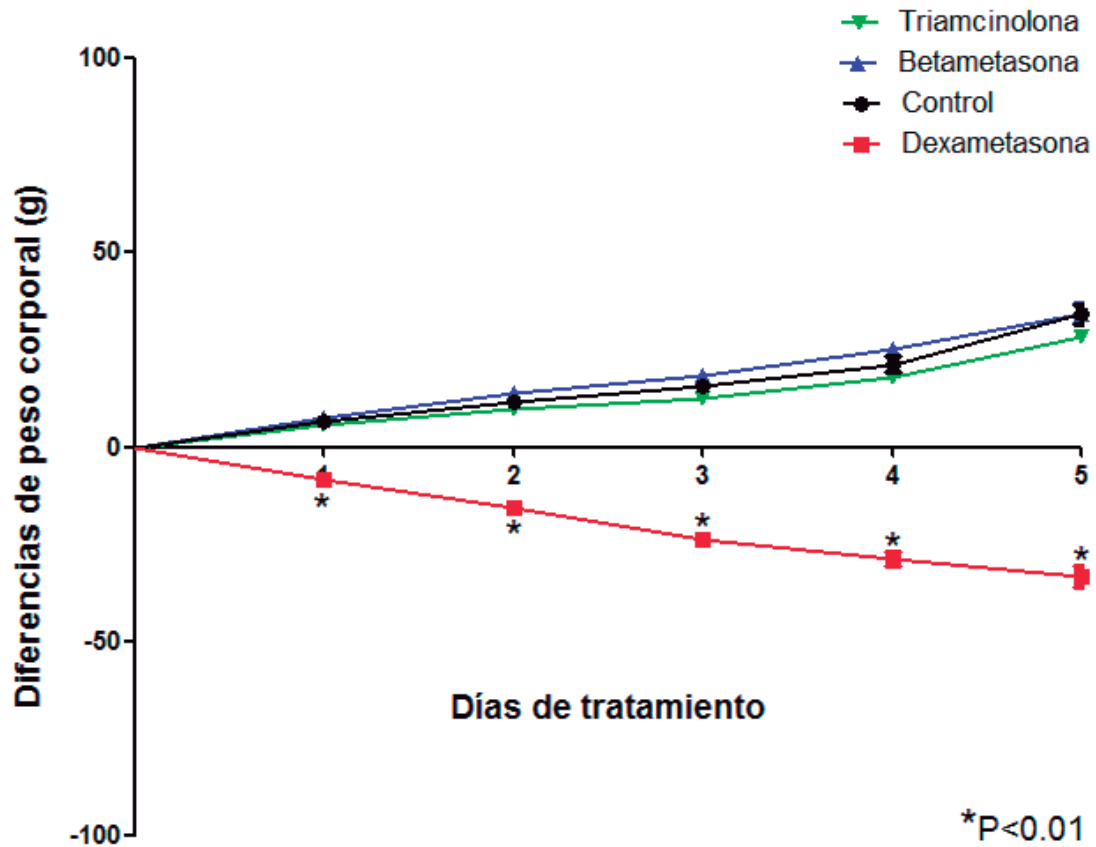


Figura 10. Diferencias en el peso corporal de las ratas durante el tratamiento con GC. Los pesos corporales son presentados en gramos y los asteriscos representan el valor de significancia de $p < 0.01$ comparado con el grupo control (prueba de Dunnett).

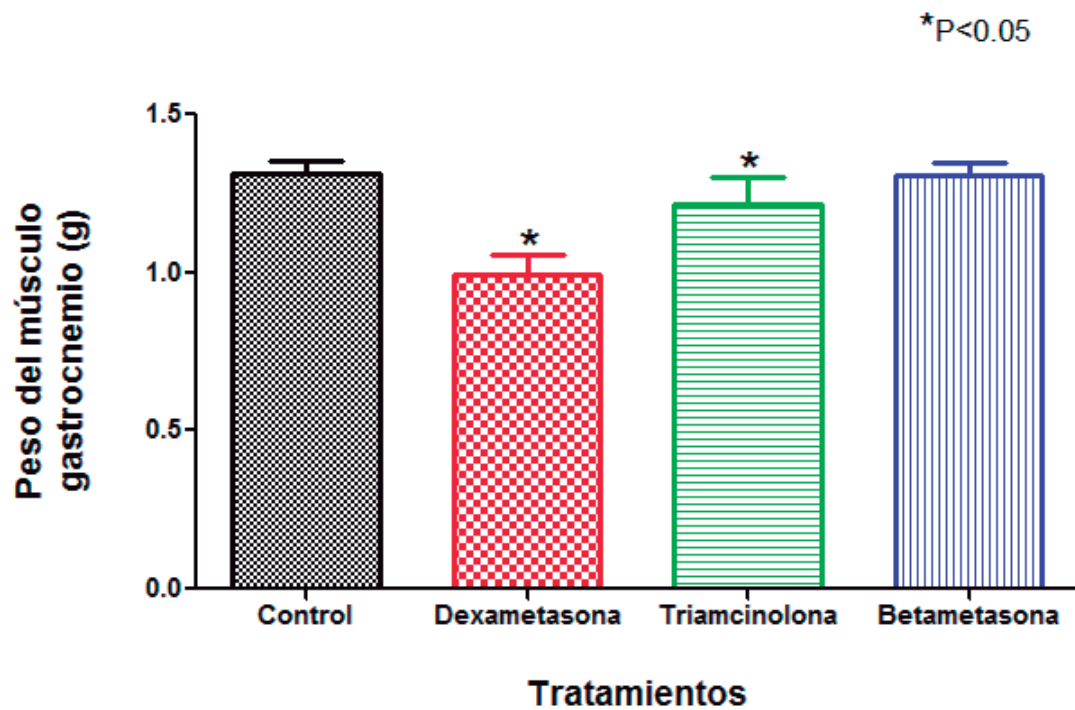


Figura 11. Efecto de los GC sobre el peso (en gramos) del músculo gastrocnemio de ratas. Los asteriscos representa el valor de significancia de $p < 0.05$ en relación al grupo control (prueba de Dunnett).

6.3 Efectos de los GC sobre el diámetro y la distribución de las fibras musculares en el músculo gastrocnemio de rata.

Para analizar los posibles cambios morfológicos en las fibras musculares desarrollados durante el tratamiento con dexametasona, triamcinolona y betametasona, se obtuvieron cortes transversales (de la parte media) de los músculos gastrocnemios de las ratas tratadas y control. Los cambios morfológicos fueron visualizados utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. En la Figura 12 se muestra un corte representativo de cada uno de los tratamientos y del control. Nuestros resultados muestran que en comparación al grupo control, el tratamiento con dexametasona provocó una marcada disminución en el grosor de las fibras musculares. Asimismo, se observaron algunos mionúcleos en el espacio intercelular, que muestran el proceso destructivo de las células musculares característico en una atrofia muscular. En el caso del tratamiento con triamcinolona, se observó un efecto menor sobre el grosor de las fibras musculares, mientras que el grosor de las fibras musculares de las ratas tratadas con betametasona fue muy similar al presentado por el grupo control.

Un análisis más detallado de los cortes histológicos de los músculos gastrocnemios mostró que en comparación al grupo control, los músculos de las ratas tratadas con dexametasona presentaron un incremento en el número de fibras musculares de menor grosor (fibras chicas) y un decremento en el número de fibras musculares de mayor grosor (fibras grandes). Estos resultados son presentados en la Figura 13 en forma de una grafica de distribución de frecuencias en relación al área de las fibras musculares. Un análisis similar de los músculos de las ratas tratadas con triamcinolona mostró un decremento en el número de fibras grandes y un incremento en el número de fibras chicas, aunque estos cambios fueron de menor magnitud a los presentados en los músculos de las ratas tratadas con dexametasona (Figura 14). En el caso del tratamiento con betametasona, este no provocó cambios significativos en el grosor de las fibras musculares, presentando una distribución de las fibras musculares muy similar a la obtenida en el grupo control (Figura 15). Una comparación cuantitativa del efecto de los diversos tratamientos sobre la densidad de fibras musculares (chicas y grandes) se presenta en la Figura 16.

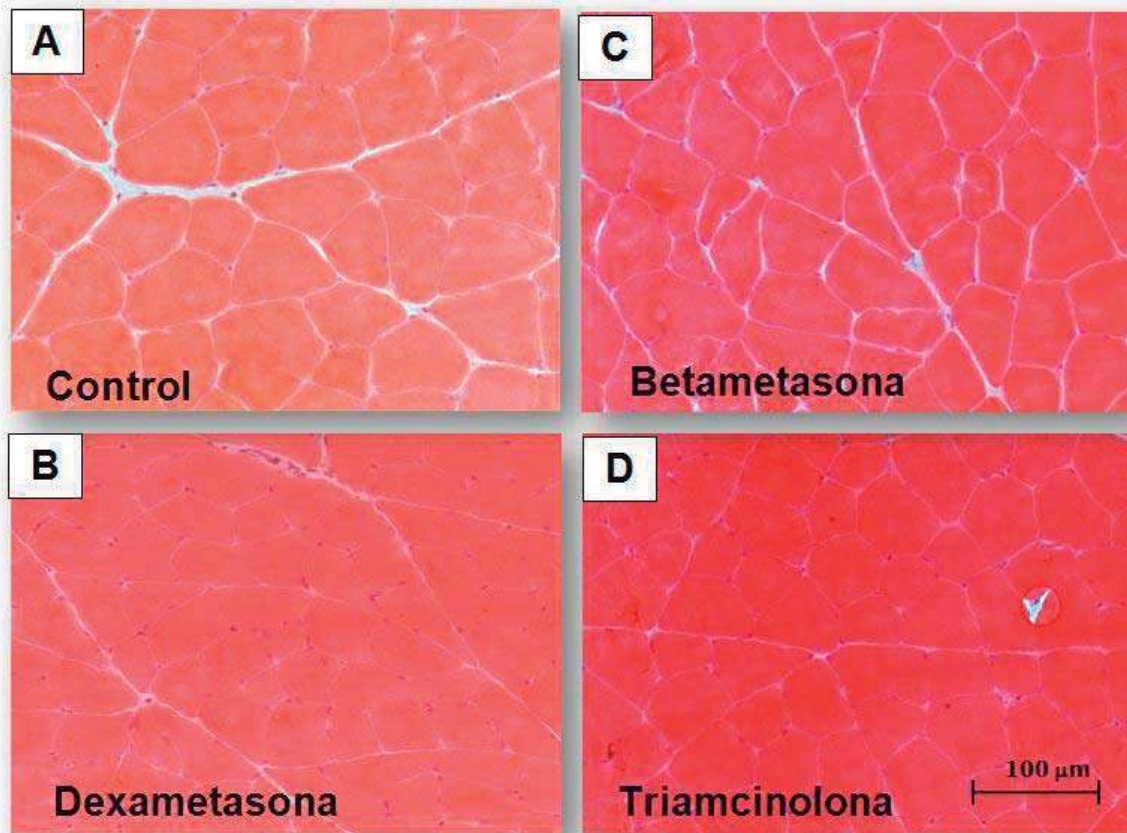


Figura 12. Cortes transversales del músculo gastrocnemio de ratas tratadas con GC. Tinción hematoxilina y eosina, 20X.

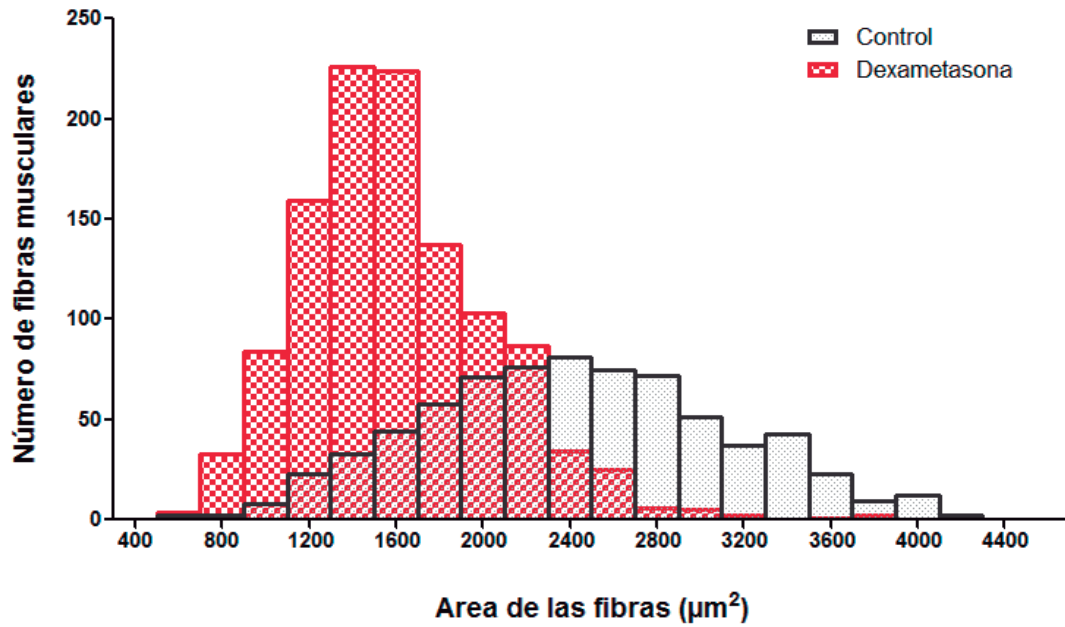


Figura 13. Distribución de frecuencia de las fibras musculares de las ratas tratadas con dexametasona.

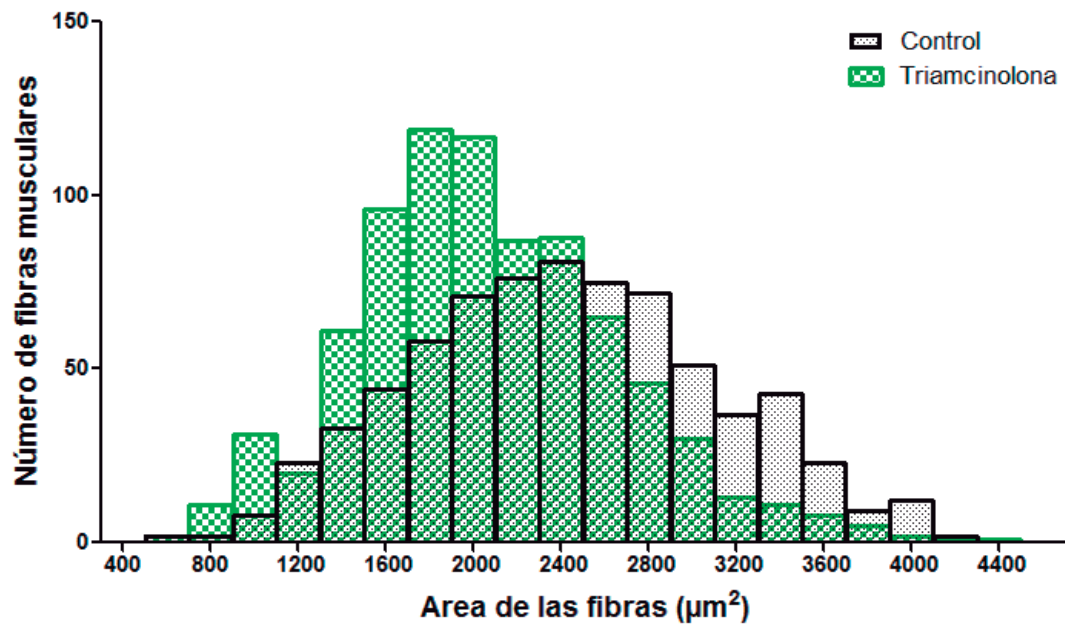


Figura 14. Distribución de frecuencia de las fibras musculares de las ratas tratadas con triamcinolona.

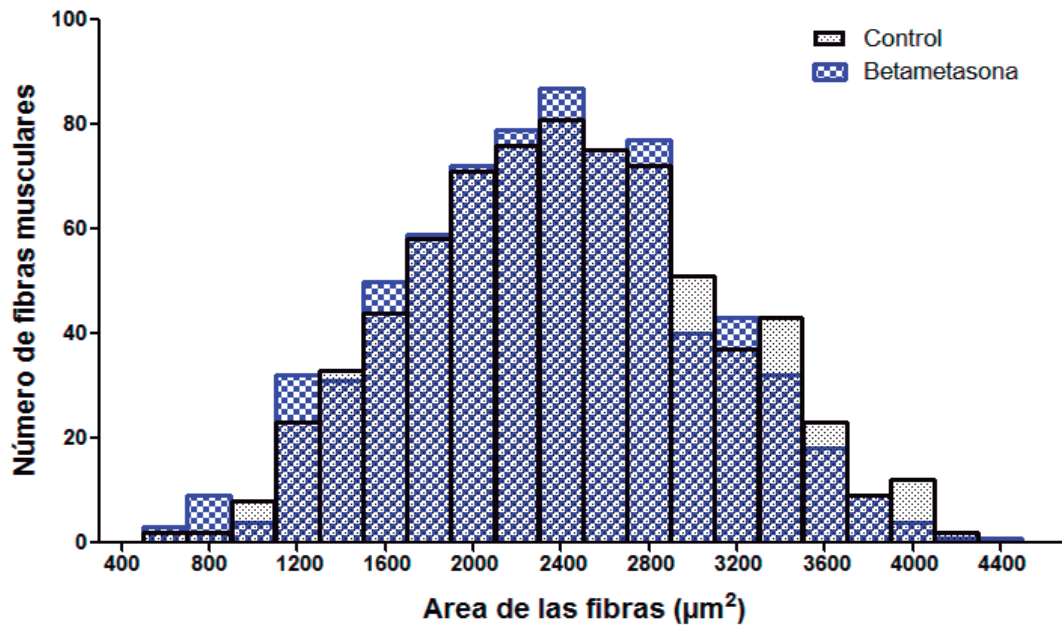


Figura 15. Distribución de frecuencia de las fibras musculares de las ratas tratadas con betametasona.

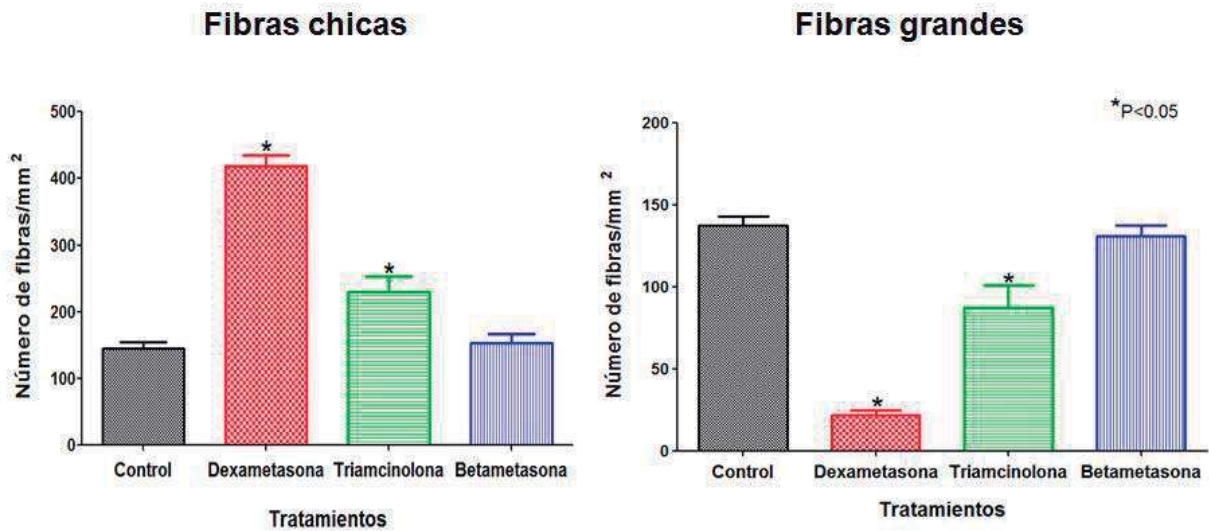


Figura 16. Cambios en el número de fibras musculares inducida por glucocorticoides. *p<0.05 comparado con el grupo control (prueba de Dunnett).

6.4 Detección de la expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio.

Una vez diseccionado el músculo gastrocnemio, se obtuvo el ARN total utilizando el reactivo de TRIzol®, que se fundamenta en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987), pudiéndose observar las bandas ARN ribosomales características de los eucariontes (28s, 18s, 5s) (Figura 17). El ARN total extraído del músculo gastrocnemio se utilizó para la detección de la expresión del gen *Mstn*, mediante la utilización de las técnicas de RT-PCR. Mediante estas técnicas se amplificó un fragmento 144 pb correspondiente a una región interna del gen *Mstn*, detectándose la expresión del mismo en todos los tratamientos, los cuales son presentados en la Figura 18 en los carriles 2-5. Los resultados muestran que la intensidad de la banda correspondiente a la expresión del gen *Mstn* en el músculo de las ratas tratadas con dexametasona y triamcinolona fue mayor que la observada en el grupo control, mientras que la correspondiente al tratamiento con betametasona se puede apreciar muy similar al grupo control.

6.5 Expresión diferencial del gen *Mstn* en respuesta a dexametasona, triamcinolona y betametasona.

La expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio de rata en respuesta al tratamiento con GC (dexametasona, triamcinolona o betametasona) se cuantificó mediante el uso de las técnicas de PCR-tiempo real y los resultados se presentan en la Figura 19. El primer GC que se evaluó fue dexametasona, este GC indujo un incremento en la expresión del gen *Mstn* con relación al grupo control, obteniendo niveles de expresión seis veces mayores a las del grupo control. Asimismo, el tratamiento con triamcinolona indujo un incremento en los niveles de expresión del gen *Mstn* en relación al grupo control, siendo este aumento de menor magnitud al observado con dexametasona. Finalmente, el tratamiento con betametasona no provocó cambios significativos en la expresión del gen *Mstn* en relación al grupo control.

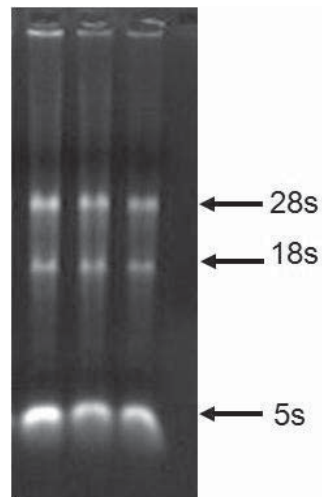


Figura 17. ARN total de músculo gastrocnemio de rata. Los tres carriles muestra el ARN total extraído utilizando el reactivo de TRizol® correspondientes a los tratamiento con GC, presentando las bandas correspondientes al ARN ribosomal, características de los eucariontes. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

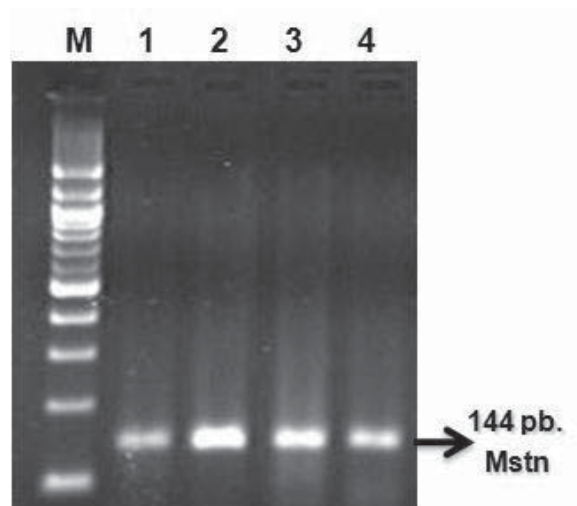


Figura 18. Identificación y amplificación del gen *Mstn* mediante la técnica RT-PCR. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio donde se muestra la amplificación del gen *Mstn* a 25 ciclos. Carriles: M) marcador 100 pb, 1) control, 2) dexametasona, 3) triamcinolona, 4) betametasona.

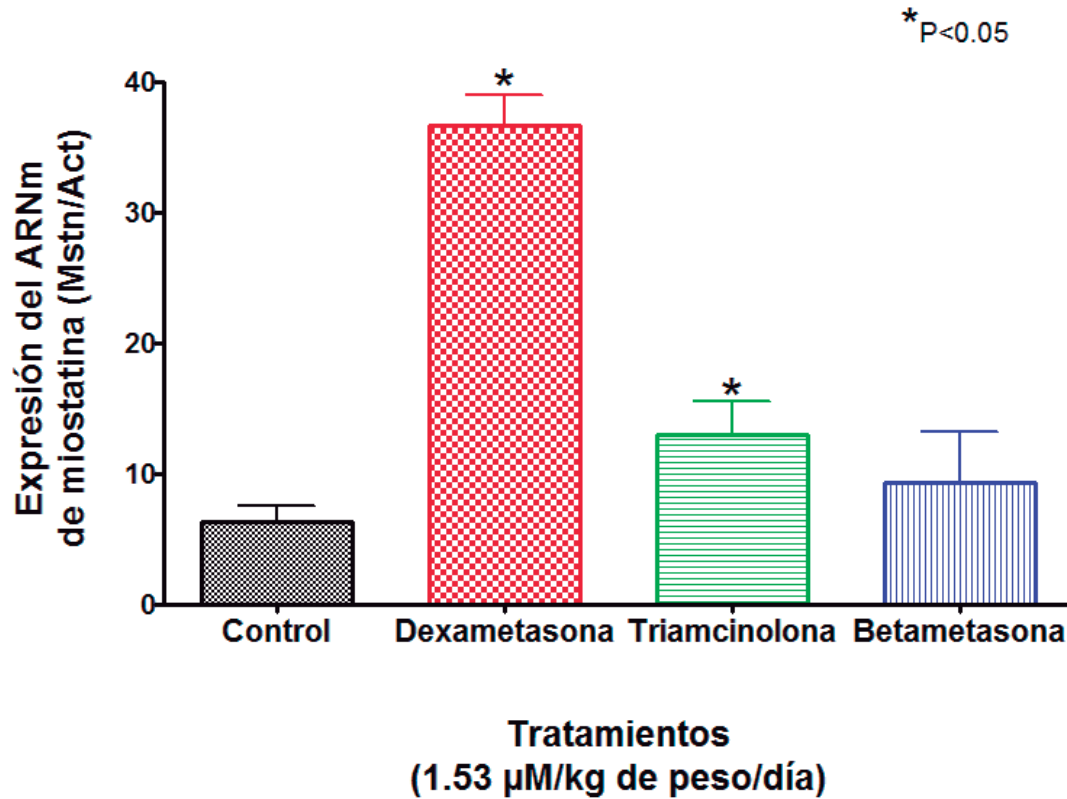


Figura 19. PCR-tiempo real del gen *Mstn*. Nivel de expresión del gen *Mstn* inducida por los GC dexametasona, triamcinolona o betametasona, a una concentración de 1.53 µM/kg de peso/día. Los asteriscos representan el nivel de significancia de $p < 0.05$ en comparación al grupo control (prueba de Dunnett).

7. DISCUSIÓN

La aplicación terapéutica de los diversos fármacos está siempre limitada por los efectos colaterales que puede producir. Un claro ejemplo son los GC, cuyo uso terapéutico como anti-inflamatorios e inmunosupresores se ha visto limitado en buena medida por el desarrollo de atrofia muscular. Por ello, en el presente trabajo se evaluaron los efectos de diferentes GC sobre el músculo esquelético de rata, observando que las diferencias entre las estructuras de los GC, son un factor determinante que modula de manera importante sus efectos sobre el músculo esquelético.

7.1 Cambios en el peso corporal de las ratas.

El incremento en el peso corporal es un proceso biológico normal en animales que están en etapa de crecimiento. En el presente trabajo se utilizaron ratas jóvenes (8-9 semanas) que están en pleno desarrollo, por lo que era de esperarse lo observado en el grupo de ratas control en donde se obtuvo un incremento diario del peso durante todo el tratamiento. La magnitud del incremento observado es similar a la reportada en la literatura para animales de la misma edad y cepa (referencia).

Los grupos de ratas tratadas con triamcinolona y betametasona presentaron un perfil de ganancia de peso semejante al del grupo control, mientras que el grupo de ratas tratadas con dexametasona presentaron una disminución del peso, siendo esta significativa (con respecto al control) desde el primer día de tratamiento. En cuanto al efecto de la dexametasona, algunos estudios sugieren que la administración de este GC pueden provocar una disminución en la ingesta de alimentos (Savary *et al.*, 1998). Por el contrario, otros estudios han mostrado que la dexametasona y la corticosterona detienen el crecimiento sin provocar una disminución en la ingesta de alimentos (Huang *et al.*, 1998, 2000; Ma *et al.*, 2003). En nuestro caso, la disminución en el peso de los animales tratados con dexametasona no es atribuible a una disminución en la ingesta de alimento, ya que no se observaron diferencias significativas en la cantidad de alimento ingerido durante los días de tratamiento.

El tratamiento con triamcinolona (0.6 mg/Kg de peso corporal) no disminuyó la tasa de crecimiento de las ratas. Aunque no existen trabajos similares con que comparar este resultado, se ha reportado que a dosis de 8 mg/Kg, que es una dosis 13 veces mayor a la utilizada en esta tesis, la triamcinolona detiene el crecimiento sin provocar una disminución en el peso corporal, mientras que a dosis superiores la triamcinolona provoca una pérdida de peso corporal (Sterling *et al.*, 1982). Si bien se puede observar que la triamcinolona, a diferencia de la dexametasona, no provoca pérdida de peso corporal es preciso señalar que la potencia farmacológica antiinflamatoria de la triamcinolona es 5 veces menor que la de la dexametasona por lo que clínicamente es necesario utilizar mayores concentraciones de triamcinolona que de dexametasona. Sin embargo, basándonos en el trabajo de Sterling *et al.*, (1982) podríamos esperar que a concentraciones farmacológicas equipotentes la triamcinolona provocará un menor efecto que la dexametasona sobre el peso corporal. Finalmente, la betametasona (que tiene una potencia GC similar a dexametasona) no solo no provocó una disminución en el peso corporal de las ratas sino que por el contrario provocó una ganancia de peso similar a la del grupo control. Estos resultados están de acuerdo con estudios en humanos que han reportado que la betametasona provoca un aumento en el apetito y en el peso corporal (Bouni *et al.*, 2006).

7.2 Evaluación de los efectos de los glucocorticoides sobre el músculo esquelético.

7.2.1 Peso del músculo gastrocnemio.

El efecto de los glucocorticoides sobre el musculo esquelético se traduce como pérdida de masa muscular que está relacionada con una disminución en el peso corporal (Ma *et al.*, 2003).

Para determinar si los efectos de los tratamientos con GC (dexametasona, triamcinolona y betametasona) observados en el peso corporal de las ratas se reflejaba con un efecto sobre el músculo esquelético, el músculos gastrocnemio derecho de las ratas tratadas y las ratas control, se disectaron y se pesaron. Los

resultados mostraron que el tratamiento con dexametasona provocó cambios en el peso de los músculos gastrocnemios de las ratas reduciendo la masa muscular aproximadamente en un 30% en relación al peso del músculo de las ratas control. Esta pérdida de masa muscular correlaciona con la disminución (del 28% aproximadamente) en el peso corporal observada en las ratas tratadas con dexametasona. Estos resultados están de acuerdo con estudios en ratas que han reportado que el tratamiento con dexametasona provoca una pérdida de masa muscular y que esta pérdida está relacionado con una disminución en el peso corporal de las ratas (Ma *et al.*, 2003). Asimismo, otros estudios han mostrado también que la dexametasona provoca una reducción en la masa del músculo gastrocnemio, así como en el tibial anterior (Gilson *et al.*, 2007). Varios estudios han reportado que esta pérdida de masa muscular es caracterizada por una depresión en la síntesis de proteínas y un aumento en la degradación de proteínas musculares provocando una reducción de masa muscular (Lecker *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2000; Schakman *et al.*, 2005).

El tratamiento con triamcinolona provocó una reducción en la masa del músculo gastrocnemio aproximadamente del 8% en relación a la presentada por el grupo control. Por otra parte, el tratamiento con betametasona no provocó una pérdida de masa muscular en comparación al peso del músculo gastrocnemio del grupo control. Se han reportado estudios donde el tratamiento con betametasona no provoca cambios en la masa de músculos conformados por fibras de contracción lenta o tipo 1 (por ejemplo músculo soleo) ni en músculos conformados por una mezcla de fibras musculares de tipo 1 y 2 (contracción lenta y rápida) como es el músculo gastrocnemio, aunque si causa un incremento en la degradación de proteínas musculares, sugiriéndose que debe haber un mecanismo compensatorio (Clark *et al.*, 1979).

7.2.2 Cambios en el tamaño de las fibras musculares.

El músculo esquelético en mamíferos presenta un gran potencial adaptativo, el cual resulta de la capacidad de las fibras musculares para ajustar sus propiedades metabólicas, funcionales y moleculares en respuesta a diferentes condiciones

ambientales, como es el aumento en los niveles de GC endógenos o la administración de GC exógenos. Los GC provocan un cambio en el metabolismo de las proteínas musculares viéndose principalmente afectado el contenido de proteínas miofibrilares, lo que se traduce en una disminución en el diámetro de las fibras musculares. De ahí que uno de los objetivos de este estudio fue determinar los cambios morfológicos inducidos por diferentes GC en las fibras musculares del músculo gastrocnemio de rata. Para evaluar estos cambios morfológicos se midió el área de la sección transversal de las fibras musculares, así como el número de fibras por área analizada. Los resultados mostraron que el tamaño de las fibras del músculo gastrocnemio de las ratas tratadas con dexametasona disminuyó en un 33% provocando un desplazamiento de la distribución de frecuencia de las fibras musculares hacia las fibras de menor tamaño en comparación a la distribución presentada por el grupo control; es decir, la dexametasona produjo un aumento en el número de fibras de menor tamaño en detrimento del número de fibras de mayor tamaño. Este efecto observado concuerda con lo reportado por Shakman *et al.* (2008), quienes encontraron que la dexametasona (100µg/kg de peso corporal/7 días) provoca una disminución en el tamaño de las fibras musculares en un 20%. Adicionalmente, varios estudios han demostrado que la disminución en el tamaño de las fibras musculares causada por la dexametasona se debe a que ésta induce de manera selectiva la degradación de la miofibrilla MyHC (cadena pesada de miosina) (Chromiak y Vandeburgh, 1992; Clarke *et al.*, 2007). De acuerdo a estas observaciones nuestros resultados indican que la disminución en el tamaño de las fibras musculares, inducido por dexametasona, se traduce en una pérdida de masa muscular y finalmente en una disminución en el peso corporal.

El tratamiento con triamcinolona, al igual que el de dexametasona, provocó una disminución (14%) en el tamaño de las fibras musculares y un desplazamiento en su distribución en comparación al grupo control, disminuyendo el número de fibras de mayor tamaño y aumentando el número de fibras de menor tamaño. Sin embargo los efectos provocados por triamcinolona fueron de menor magnitud a los observados con dexametasona. En contraste a nuestros resultados, estudios realizados por Hatakenaka *et al.*, (2006) en conejos, mostraron que la triamcinolona provoca una

disminución en el tamaño de las fibras del músculo gastrocnemio (27%), sin embargo, es preciso señalar que en ese estudio se usaron concentraciones de triamcinolona más altas a las utilizadas en el presente trabajo (3 mg/kg de peso vs. 600 µg/kg de peso), así como un periodo mayor de tratamiento (10 días vs. 5 días). Con respecto al tratamiento con betametasona, este no provocó cambios (disminución) significativos en el tamaño de las fibras musculares, presentando una distribución de frecuencia de las fibras muy similar a la obtenida con el grupo control. El ligero incremento en el número de fibras de menor tamaño en detrimento de las fibras de mayor tamaño provocados por betametasona, posiblemente se deba a una disminución en el tamaño de algunas fibras musculares de contracción rápida presentes en el músculo gastrocnemio, que según reportes en la literatura son afectadas mayormente por GC (Clark *et al.*, 1979).

7.3 Análisis de la expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio.

7.3.1 Detección de la expresión del gen *Mstn*.

Para poder analizar la expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio se realizó primero la detección del gen en el músculo esquelético. Como se muestra en la figura 18 (carril 2, correspondiente al grupo control) se observa claramente una banda de 144 pb que corresponde al peso molecular esperado para el fragmento interno del gen *Mstn* amplificado. La detección del gen *Mstn* en el presente trabajo de tesis se realizó en el músculo esquelético de ratas jóvenes, que se encuentran en etapa de crecimiento, corroborando lo reportado en varios trabajos que indican que el gen *Mstn* se expresa en el tejido muscular, no sólo durante el desarrollo embrionario pero también después del nacimiento (González-Cadaviz *et al.*, 1998; Grobet *et al.*, 1997; Kocamis *et al.*, 2002; Shaoquan *et al.*, 1998).

7.3.2 Análisis de la expresión del gen *Mstn* en respuesta a los GC.

Muchos tipos de atrofas del músculo esquelético van acompañadas por un cambio en la expresión del gen de la miostatina (Lecker *et al.*, 2004; Durieux *et al.*, 2007). De

ahí que otro de nuestros objetivos fue evaluar la expresión del gen *Mstn* en la atrofia muscular inducida por GC.

La cuantificación mediante PCR-Tiempo Real de la expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio, mostró que el tratamiento con dexametasona incrementa la expresión del gen 5.8 veces en relación al nivel de expresión presentado por el grupo control. Estos resultados están de acuerdo con estudios que reportan que la dexametasona provoca un incremento en la expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio de rata (Ma *et al.*, 2003) y apoyan la propuesta de que la atrofia muscular inducida por dexametasona se debe en gran parte a un incremento en la expresión de miostatina (Gilson *et al.*, 2007).

El tratamiento con triamcinolona, al igual que el de dexametasona, incrementa la expresión del gen *Mstn*. Sin embargo este incremento fue solo de 2 veces en relación al grupo control, es decir, que en concentraciones equimolares la triamcinolona es menos potente para incrementar la expresión del gen *Mstn* en músculo gastrocnemio de rata.

La betametasona mostró un efecto sobre la expresión del gen *Mstn* diferente al de los dos GC descritos anteriormente, ya que aunque incremento la expresión del gen, este incremento no fue significativo en relación al grupo control. La betametasona es un diasterómero de la dexametasona, es decir, son esteroisómeros que se diferencian solo en el arreglo espacial en torno al carbono (quiral) de la posición 16 (Figura 7). Nuestros resultados enfatizan la importancia de la quiralidad, en este caso, la diferencia del arreglo espacial entre las moléculas de betametasona y dexametasona resultó en una diferencia en la magnitud (potencia) de la inducción de la expresión del gen *Mstn*. Esto implica que este centro quiral podría estar participando (influyendo) en forma determinante en la interacción GC-receptor-ADN necesaria para modular la expresión del gen *Mstn*, cosa que no sucede en el caso del efecto antiinflamatorio en donde la betametasona y la dexametasona son equipotentes.

7.4 Consideraciones generales.

El gen *Mstn* se ha relacionado con el desarrollo de la atrofia del músculo esquelético observada como un efecto secundario en varias enfermedades, así como durante el tratamiento con GC ya que se ha reportado que los niveles de expresión del gen *Mstn* están incrementados en el músculo atrofiado (Baumann *et al.*, 2003; Gonzales-Cadavid *et al.*, 1998; Mallidis *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2003; Zimmers *et al.*, 2002). De acuerdo con otros estudios, los resultados de este trabajo muestran que la administración de dexametasona durante 5 días es suficiente para provocar una disminución significativa en el peso corporal de los animales, una disminución significativa en el peso del músculo gastrocnemio, así como un incremento significativo en los niveles de expresión del gen *Mstn* en el músculo gastrocnemio (Seene, 1994; Goodlad y Clark, 1991; Ma *et al.*, 2003; Gilson *et al.*, 2007). El tratamiento con dexametasona también indujo una disminución en el área transversal de un gran número de fibras musculares, lo que resultó en un aumento en el número de fibras de menor tamaño y en una consecuente disminución de las fibras de mayor tamaño del músculo gastrocnemio.

El tratamiento con triamcinolona, provocó un menor incremento en la expresión del gen *Mstn* que dexametasona y aunque este incremento no se reflejó en una disminución en el peso corporal de las ratas tratadas, si se presentó una reducción ligera pero significativa en la masa del músculo gastrocnemio y en el tamaño de las fibras musculares. Estas observaciones nos sugieren que la triamcinolona y la dexametasona, aun cuando difieren en potencia, usan un mecanismo similar (inducción de la expresión del gen *Mstn*) para producir atrofia muscular.

Finalmente, el tratamiento con betametasona solo provocó un ligero aumento no significativo en la expresión del gen miostatina, el cual no se reflejó en cambios sobre el peso corporal ni en una pérdida de masa del músculo gastrocnemio. Estos resultados discrepan de los obtenidos con su diasterómero dexametasona, sugiriendo que las diferencias en la estructura (quiralidad), son un factor determinante en cuanto al efecto sobre la expresión del gen *Mstn* de los GC.

En resumen, los resultados del presente trabajo indican que el nivel de expresión del gen *Mstn* provocado por un GC depende, de manera determinante, de su estructura. Asimismo, que el grado de atrofia muscular que produce un GC esta correlacionado con los niveles de expresión del gen *Mstn* que induce. Es decir, que una inducción fuerte de la expresión del gen *Mstn* provoca un grado de atrofia muscular considerable, mientras que una inducción del gen pequeña (no significativa) podría no tener efectos (atróficos) sobre el músculo.

8.- CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten concluir que:

El nivel de expresión del gen *Mstn* en músculo esquelético de rata depende del GC empleado, existiendo una relación directa entre el grado de atrofia muscular inducido y el nivel de expresión del gen *Mstn*.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta investigación nos indican que existe una relación directa entre el grado de atrofia muscular inducido por los GC y el nivel de expresión del gen *Mstn*. Por ello, es importante la búsqueda de otros GC que al igual que la betametasona presenten mínimos efectos sobre la expresión del gen *Mstn* y probablemente menores efectos atróficos sobre el músculo esquelético.

A nivel molecular sería importante estudiar como las diferencias en la estructura de los GC influyen sobre la conformación del receptor o sobre el complejo receptor-DNA para poder explicar las diferencias en la regulación génica.

Por otra parte, también sería importante investigar los efectos de triamcinolona sobre los niveles de expresión del gen *Mstn*, a dosis equipotentes en relación a dexametasona.

Debido a que el uso terapéutico de los GC en algunas enfermedades que se presentan a edades avanzadas (como artritis reumatoides, colitis ulcerosa) sería interesante determinar el efecto que diversos GC tienen sobre los niveles de expresión del gen *Mstn* y la producción de atrofia muscular en ratas de mayor edad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams G. R. 2006. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31: 782-790.
- Adcock I.M. 2003. Glucocorticoids: New mechanisms and future agents. *Current Allergy and Asthma Reports* 3: 249–257.
- Agbulut O., Noirez P., Beaumont F. y Butler-Browne G. 2004. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol. Cell.* 95: 399–406.
- Almon R.R., DuBois D.C., Yao Z., Hoffman E.P., Ghimbovski S. y Jusko W.J. 2007. Microarray analysis of the temporal response of skeletal muscle to methylprednisolone: comparative analysis of two dosing regimens. *Physiol. Genomics.* 30: 282–299.
- Amirouche A., Durieux A. C., Banzet S., Koulmann N., Bonnefoy R., Mouret C., Bigard X., Peinnequin A. y Freyssenet D. 2009. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinol.* 150: 286-294.
- Arnold H., Della-Fera M. A. y Baile C. A. 2001. Review of myostatin history, physiology and applications. *Int. Arch. Biosci.* 1: 1014-1022.
- Bamberger C. M., SCHULTE H. M. y Chrousos G. P. 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews.* 17: 245-261.
- Baumann A. P., Ibebunjo C., Grasser W. A. y Paralkar V.M. 2003. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J. Musculoskel Neuron. Interact.* 3: 8-16.
- Berry C., Thomas M., Langley B., Sharma M. y Kambadur R.. 2002. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C135-141.
- Biressi S., Molinaro M. y Cossu G. 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Develop. Biol.* 308: 281-293.

Bolster D. R., Jefferson L. S. y Kimball S. R. 2004. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signaling. *Proc. Nutr. Soc.* 63: 351–356.

Buoni S., Zannolli R., Colamaria V., Macucci F., di Bartolo R. M., Corbini L., Orsi A., Zappella M. y Hayek J. 2006. Myoclonic encephalopathy in the CDKL5 gene mutation. *Clinical Neurophysiology.* 117: 223–227.

Brennan T. J., Edmondson D. G., Li L. y Olson E. N. 1991. Transforming growth factor f8 represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3822-3826.

Buckingham M., Bajard L., Chang T., Daubas P., Hadchouel J., Meilhac S., Montarras D., Rocancourt D. y Relaix F. 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* 202: 59–68.

Bulteau H. R., Serrurier B., Crassous B., Banzet S., Peinnequin A., Bigard X. y Koulmann N. 2008. Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294: C467–C476

Cheng L., Rossi F., Fang W., Mori T. y Cobrinik D. 2000. Cdk2-dependent phosphorylation and functional inactivation of the pRB-related p130 Protein in pRB(-), p16^{INK4A}(+) tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275: 30317–30325.

Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thicyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162: 156-159.

Christ, B. y Ordahl, C. P. 1995. Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol.* 191: 381-396.

Chromiak, J. A. y Vandeburgh H. H. 1992 Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy in vitro is attenuated by mechanical stimulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 262: C1471-C1477.

Clark A. F. y Vignos Jr. P. J. 1979. Experimental corticosteroid myopathy: Effect on myofibrillar ATPase activity and protein degradation. *Muscle y Nerve.* 2: 265-273.

Clarke B. A., Drujan D., Willis M. S., Murphy L. O., Corpina R. A., Burova E., Rakhilin S. V., Stitt T. N., Patterson C., Latres E. y Glass D. J. 2007. The E3 ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 6: 376–385.

Costa J. 2004. Real-Time PCR. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22: 299-305.

Crisa A., Marchitelli C., Savarese M. S., Valentini A. 2003. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenet Genome Res.* 102: 48–52.

Cosío B.G., Torrego A. y Adcock I.M. 2005. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol.* 41: 34-41.

Derynck R., Zhang Y. y Feng X. H. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell.* 95: 737–740.

Deveaux V., Picard B., Bouley J. y Cassar-Malek I. 2003. Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 527-542.

Distelhorst C. W. 2002. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid induced apoptosis. *Cell Death Differentiation.* 9: 6-19.

Du R., Du R., Chen Y. F., An X. R., Yang X. Y., Ma Y., Zhang L., Yuan X. L., Chen L. M. y Qin J. 2005. Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep. *Mitochondrial DNA.* 16: 412-417.

Durieux A. C., Amirouche A., Banzet S., Koulmann N., Bonnefoy R., Padeloup M., Mouret C., Bigard X., Peinnequin A. y Freyssenet D. 2007. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinol.* 148: 3140–3147.

Duxson M.J. y Sheard P.W. 1995. Formation of new myotubes occurs exclusively at the multiple innervation zones of an embryonic large muscle. *Develop. Dynamics.* 204: 391406

Dwyer C. M., Stickland N. C. y Fletcher J. M. 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J Anim Sci* 1994. 72: 911-917.

Eley H. L. y Tisdale M. J. 2007. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *J. Biol. Chem.* 282; 7087–7097.

Fernandez del Nacimiento, C. 2004. Comportamiento in vitro de alelos recombinantes del gen de la miostatina para su aplicación en producción animal. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. 170 pp.

Feldman B. J., Streeper R. S., Farese R. V., Jr. Yamamoto K. R. y Yamamoto K. R. 2006. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *PNAS.* 103: 15675–15680.

Filho J. C. S. C., Vanderlei L. C. M., Camargo R. C. T., Francischeti F. A., Belangero W. D. y Pai V. D. 2006. Effects of the anabolic steroid nandrolone on the soleum muscle of rats submitted to physical training through swimming: histological, histochemical and morphometrical study. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 12: N° 5 – Set/Out.

Fournier M., Huang Z. S., Li H., Da X., Cercek B. y Lewis M. I. 2003. Insulin-like growth factor I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R34–R43.

Flück M. 2006. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J. Exp. Biol.* 209: 2239-2248.

Glass D. J. 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 5: 87-90.

Gilson H., Schakman O., Combaret L., Lause P., Grobet L., Attaix D., Ketelslegers J. M. y Thissen J.P. 2007. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinol.* 148:452-460.

Gleizes P. E., Munger J. S., Nunes I., Harpel J. G., Mazzieri R., Noguera I. y Rifkin D. B. 1997. TGF- β latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*. 15: 190-197.

Gomis R. R., Alarcón C., He W., Wang Q., Seoane J., Lash A. y Massague J. 2006. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *PNAS*. 103: 12747–12752.

Gonzalez-Cadavid N. F., Taylor W. E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair G., Arver S. y Bhasin S. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 14938-14943.

Gosker H. R., Engelen M. PKJ., Mameren H. V., Dijk P. J. V., Van der Vusse G. J., Wouters E. FM y Schols A. MWJ. 2002. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 113–119.

Goodlad G. A. y Clark C. M. 1991. Glucocorticoid-mediated muscle atrophy: alterations in transcriptional activity of skeletal muscle nuclei. *Biochim. Biophys. Acta*. 1097: 166–170.

Goodpaster B. H., Park S. W., Harris T. B., Kritchevsky S. B., Nevitt M., Schwartz A. V., Simonsick E. M., Tylavsky F. A., Visser M. y Newman A. B. 2006. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *Gerontol. Soc. Am.* 61; 1059–1064.

Graziotti G., Ríos C. y Basso L. 2000. Las fibras musculares esqueléticas y la producción de carne en el cerdo. *Rev. Arg. de Prod. Animal Bs. As.*, 20(2):145-159.

Grobet L., Martin L. J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R. y Georges M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17: 71-74.

Gullberg D. 2003. The molecules that make muscle. *Nat.* 424: 138-140.

Guo K., Wang J., Andrés V., Smith R. C. y Walsh K. 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3823–3829.

Guo W., Flanagan J., Jasuja R., Kirkland J., Jiang L. y Bhasin S. 2008. The effects of myostatin on adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells are mediated through cross-communication between smad3 and wnt/ β -catenin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 283: 9136–9145.

Gupta B.B.P. y Lalchandama K. 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Curr. Sci.* 83:1103-1111.

Gupta V, Wagner BJ. 2003. Expression of the functional glucocorticoid receptor in mouse and human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 44: 2041–2046.

Hamrick M., Shi X., Zhang W., Pennington C., Thakore H., Haque M., Kang B., Isaacs C.M., Fulzele S. y Wenger K. 2007. Loss of Myostatin (GDF8) Function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading. *Bone.* 40: 1544–1553.

Hasselgren P.O. 1999. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr. Opinion Clin. Nutr. Metab. Care.* 2: 201-205.

Hatakenaka M., Soeda H., Okafuji T., Yabuuchi H., Shiokawa S., Nishimura J. y Honda H. 2006. Steroid myopathy: evaluation of fiber atrophy with T2 relaxation time-rabbit and human study. *Radiol.* 238: 650-657.

Hood D.A. Irrcher I., Ljubicic V. y Joseph A.M. 2006. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 209: 2265-2275.

Huang, H., Gazzola C., Pegg G. G. y Sillence M. N. 1998. Effect of corticosterone on β -adrenoceptor density in rat skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 76: 999–1003.

Huang H., Gazzola C., Pegg G. G. y Sillence M. N. 2000. Differential effects of dexamethasone and clenbuterol on rat growth and on beta2-adrenoceptors in lung and skeletal muscle. *J. Animal Sci.* 78: 604-608.

Imae M., Fu Z., Yoshida A., Noguchi T. y Kato H. 2003. Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J. Mol. Endocrinol.* 30: 253–262.

Ishibashi J., Perry R. L., Asakura A. y Rudnicki M. A. 2005. MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH₂- and COOH-terminal regions. *J. Cell Biol.* 171: 471–482.

Jin H.J., Dunn M.A., Borthakur D., Kim Y.S. 2004. Refolding and purification of unprocessed porcine myostatin expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 35: 1-10.

Joulia-Ekaza D. y Cabello G. 2007. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Current Opinion in Pharmacology.* 7: 310–315.

Joulia D., Bernardi H., Garandel V., Rabenoelina F., Vernus B. y Cabello G. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* 286: 263-75.

Kambadur R., Sharma M., Smith T. P. y Bass J. J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7: 910-916.

Kim H. J., Güth R., Jonsson C. B. y Unguez G. A. 2009. *S. macrurus* myogenic regulatory factors induce mammalian skeletal muscle differentiation: Evidence for functional conservation of MRFs. *J. Dev. Biol.* 53: 993–1002.

Kitzmann M., Carnac G., Vandromme M., Primig M., Lamb N. J.C. y Fernandez A. 1998. The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol.* 142: 1447–1459.

Kitzmann M. and Fernandez A. 2001. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 571-579.

Kollias H. D., y McDermott J. C. 2008. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104: 579–587.

Kocamis H. y Killefer J. 2002. Myostatin expression and posible functions in animal muscle growth. *Domestic Animal Endocrinol.* 23: 447-454.

Kristel J.M., Boonen M. Sc. y Post M. J., M.D., Ph.D. 2008. The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration. *Tissue Engineering.* 14: 419-431.

Lang C. H., Silvis C., Nystrom G. y Frost R. A. 2001. Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury. *FASEB J.* 15: 1807-1809.

Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S. y Kambadur R. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating myod expression. *J. Biol. Chem.* 277: 49831–49840.

Lecker S. H., Solomon V., Mitch W. E. y Goldberg A. L. 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* 129: 227S–237S.

Lecker S. H., Jagoe R. T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., PRICE S. R., MITCH W. E. y Goldberg A. L. 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18; 39-51.

Lee S. J. 2004. Regulation of Muscle Mass by Myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 61–86.

Lee S. J. 2007. Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess. *Trends Genet.* 23; 475-477.

Lee S. J. y McPherron A. C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS.* 98: 9306-931.

Legerlotz K., Elliott B., Guillemin B. and Smith H.K. 2008. Voluntary resistance running wheel activity pattern and skeletal muscle growth in rats. *Exp. Physiol.* 93.6: 754–762.

Lépine S., Lakatos B., Courageot M. P., Stunff H. L., Sulpice J. C. y Giraud F. 2004. Sphingosine contributes to glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes independently of the mitochondrial pathway. *J. Immunology.* 173: 3783-3790.

Liu Z., Li G., Kimball S. R., Jahn L. A. y Barrett E. J. 2004. Glucocorticoids modulate amino acid-induced translation initiation in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E275–E281.

Löfberg E., Gutierrez A., Wernerman J., Anderstam B., Mitch W. E., Price S. R., Bergström J. y Alvestrand A. 2002. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *European J. Clin. Inves.* 32: 345-353.

Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gózález-Cadavid N. y Bhasin S. 2001. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone *in vitro*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: E1128-E1136.

Ma K., Mallidis C., Bhasin S., Mahabadi V., Artaza J., Gózález-Cadavid N., Arias J. y Salehian B. 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expresión. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E363-E371.

Mallidis C., Bhasin S., Matsumoto A., Shen R. y Gonzalez-Cadavid N. F. 1999. Skeletal muscle myostatin in a rat model of aging-related sarcopenia. *Proc. Endocrine Soc. 81st Annual Meeting. San Diego.* 73 pp.

Marieb E. N. y Hoehn K. 2007. *Human Anatomy and Physiology*. 7th ed. Pearson. USA. 27: 1088-1089.

Marshall S., Milligan A. y Yates R. 1994. Experimental techniques and anesthesia in the rat and mouse. *Anzccarte Facts Sheet Anzccart News* 7: 4.

Massagué J. y Wotto D. 2000. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745-1754.

Massagué J., Seoane J. y Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19: 2783-2810.

McCroskery S., Thomas M., Maxwell L., Sharma M. y Kambadur R. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* 162: 1135-1147.

McFarlanea C., Langleya B., Thomasa M., Hennebrya A., Plummera E., Nicholasa G., McMahona C., Sharmaa M. y Kambadur R. 2005. Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. *Develop. Biol.* 283: 58-69.

McFarlanea C., Plummer E., Thomas M., Hennebry A., Ashby M., Ling N., Smith H., Harma S. M., Kambadur R. 2006. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 209: 501-514.

McKoy G., Bicknell K. A., Patel K. y Brooks G. 2007 Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular Res.* 74: 304-312.

McManus J. F. A. y Mowry R. W. 1960. Staining methods: histologic and histochemical medical division. New York: Harper & Brother. pp. 283-310.

McPherron A. C. y Lee S. J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94; 12457-12461.

McPherron A. C., Lawler A. M. y LEE S. J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF β super family member. *Nature.* 387: 83-90.

Messina G. y Cossu G. 2009. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *Genes Dev.* 23: 902-905.

Mitchell P. J., Johnson S. E., y Hannon K. 2002. Insulin-like growth Factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb. *Devlop. Dynamics.* 223: 12-23

Mitch W. E. 2000. Mechanisms accelerating muscle atrophy in catabolic diseases. *Trans. Am. Clin. Climatol.* 111: 258-270.

Mitch W. E. y Goldberg A. L. 1996. Mechanisms of muscle wasting: the role of the ubiquitin-proteasome pathway. *NEJM.* 335: 1897-1905.

Mitch W.E. y Price S.R. Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions. *J. Ren. Nutr.* 13(2):149-152.

Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T., Furuya T. y Miyazono K. 2002. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signaling. *Genes Cells*. 7: 1191–1204.

Molkentin J. D. y Olson E. N. 1996. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 9366-9373.

Mosher D. S., Quignon P., Bustamante C. D., Sutter N. B., Mellersh C. S., Parker¹ H. G. y Ostrander E. A. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *Plos Genet*. 3: e79.

Morissette M. R., Cook S. A., Foo S. Y., McKoy G., Ashida N., Novikov M., Scherrer-Crosbie M., Li L., Matsui T., Brooks G. y Rosenzweig A. 2006. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of akt. *Circ. Res*. 99: 15-24.

Necela B.M. and Cidlowski J.A. 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc. Am. Thor. Soc*. 1: 239-246.

Ogut O., Hossain M. M. y Jin J. P. 2003. Interactions between nebulin-like motifs and thin filament regulatory proteins. *J. Biol. Chem*. 278: 3089–3097.

Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J. J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J., Bravo-Patiño A., Baizabal-Aguirre V. M. **2007**. Innate immune response of the mammary gland to pathogenic bacteria responsible of mastitis. *J. Infect*. 54: 399-409.

Parker K. L. y Schimmer B. P. 1996. The roles of the nuclear receptor steroidogenic factor 1 in endocrine differentiation and development. *Trends Endocrinol. Metabol*. 7: 203-207.

Patrino M., Caliaro F., Maccatrozzo L., Sacchetto R., Martinello T., Toniolo L., Reggiani C., y Mascarello F. 2008. Myostatin shows a specific expression pattern in pig skeletal and extraocular muscles during pre- and post-natal growth. *Differentiation*. 76:168–181.

Pratt W. B. y Toft D. O. 1997. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endocrine Reviews*. 18: 306-360.

Raghunath M., Unsöld C., Kubitscheck U., Bruckner-Tuderman L., Peters R. y Meuli M. 1998. The cutaneous microfibrillar apparatus contains latent transforming growth factor- β binding protein-1 (LBTP-1) and is a repository for latent TGF- β 1. *J. Invest. Dermatol.* 111: 559-564.

Rebbapragada A., Benchabane H., Wrana J. L., Celeste A. J. y Attisano L. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7230–7242.

Reisz-Porszasz S., Bhasin S., Artaza J. N., Shen R., Sinha-Hikim I., Hogue A., Fielder T. J. y Gonzalez-Cadavid N. F. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E876–E888.

Rescan P. Y., Jutel I. y Rallièrè C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204: 3523–3529.

Ríos R., Carneiro I., Arce V. M. y Devesa J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: 993-999.

Ríos R., Fernández-Nocelos S., Carneiro I., Arce V. M. y Devesa J. 2004. Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests that myostatin acts as an autocrine factor in vivo. *Endocrinol.* 145: 2795–2803.

Royo M. L. J. 2002. Secuenciación y análisis del gen de la miostatina bovina. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. 119 pp.

Röckl K. S. C., Hirshman M. F., Brandauer J., Fujii N., Witters L. A. y Goodyear L. J. 2007. Skeletal muscle adaptation to exercise training AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes.* 56: 2062-2069

Ross J. J., Duxson M. J. y Harris A. J. 1987. Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. *Embryonic skeletal muscle development.* 100: 383-394.

Sandri M. 2007. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiol.* 23: 160-170.

Santiago-Jiménez J.C. 2008. Regulación por glucocorticoides de la expresión del gen que codifica para la proteína miostatina en epitelio mamario de bovino. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 90pp.

San Miguel J.F., Creixenti J. B. y García-Sanz R. 1999. Treatment of multiple myeloma. *Haematol.* 84: 36-58.

Sacheck J.M., Ohtsuka A., McLary S.C. y Goldberg A.L. 2004. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: 591-601.

Sacheck J. M., Hyatt J. P. K., Raffaello A., Jagoe R. T., Roy R. R., Edgerton V. R., Lecker S. H. y Goldberg A. L. 2007. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 21: 140-155.

Sato Y., Okada F., Abe M., Seguchi T., Kuwano M., Sato S., Furuya A., Hanai N. y Tamaoki T. 1993. The mechanism for the activation of latent TGF- β during co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells: cell-type specific targeting of latent TGF- β to smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 123: 1249-1254.

Savary I., Debras E., Dardevet D., Sornet C., Capitan P., Prugnaud J., Mirand P. P. y Grizard J. 1998. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. *Br. J. Nutr.* 79: 297–304.

Schacke H., Döcke W. D. y Asadullah K. 2002. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology y Therapeutics.* 96: 23-43.

Schuelke M., Wagner K. R., Stolz L. E., Hubner C., Riebel T., Komen W., Braun T., Tobin J. F., y Lee S. J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 350; 2682–2688.

Schwartz L. M. 2008. Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. *Cell Death Diff.* 15: 1163–1169.

Schakman O., Gilson H., de Coninck V., Lause P., Verniers J., Havaux X., Ketelslegers J. M. y Thissen J. P. 2005. Insulin-Like Growth Factor-I Gene Transfer by Electroporation Prevents Skeletal Muscle Atrophy in Glucocorticoid-Treated Rats. *Endocrinol.* 146:1789–1797.

Schakman O., Kalista S., Bertrand L., Lause P., Verniers J., Ketelslegers J. M. y Thissen J. P. 2008. Role of Akt/GSK-3 β / β -catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinol.* 149: 3900–3908.

Scott W., Stevens J. y Binder-Macleod S. A. 2001. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther.* 81:1810 –1816.

Seiffert M., Gosenca D., Ponelies N., Ising N., Patel M. B., Obertacke U. y Majetsghak M. 2007. Regulation of the ubiquitin proteasome system in mechanically injured human skeletal muscle. *Physiol. Res.* 56: 227-233.

Seene T. 1994. Turnover of skeletal muscle contractile proteins in glucocorticoid myopathy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 50: 1–4.

Shah O. J., Kimball S. R. y Jefferson L. S. 2000. Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278: 76-82.

Shaoquan J., Losinski R. L., Cornelius S. G., Frank G. R., Willis G. M., Gerrard D. E., Depreux F. F. S. y Spurlock M. E. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 275: 1265-1273.

Shi Y. y Massague J. 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 13: 685–700.

Southgate R. J., Neill B., Prelovsek O., El-Osta A., Kamei Y., Miura S., Ezaki O., McLoughlin T. J., Zhang W., Unterman T. G. y Febbraio M. A. 2007. FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 284: 21176–21186.

Spiller M. P., Kambadur R., Jeanplong F., Thomas M., Martyn J. K., Bass J. J. y Sharma M. 2002. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7066–7082.

Sterling K. M., DiPetrillo Jr. T., Cutroneo K. R. y Prestayko A. 1982. Inhibition of collagen accumulation by glucocorticoids in rat lung after intratracheal bleomycin instillation. *Cancer Res.* 42: 405-408.

Stewart C.E.H. y Rittweger J. 2006. Adaptive processes in skeletal muscle: Molecular regulators and genetic influences *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* 6: 73-86.

Taylor A.W. 2008. Review of the activation of TGF- β in immunity. *J. Leukocyte Biol.* 85: 1-5.

Taylor A.W. Bhasin S., Artaza J., Byhower F., Azam M., Willard D. H., Kull Jr. F. C., y Gonzalez-Cadavid N. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C₂C₁₂ muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: 221-228.

Telley I. A., Denoth J., Stüssi E., Pfitzer G. y Stehle R. 2006. Half-sarcomere dynamics in myofibrils during activation and relaxation studied by tracking fluorescent markers. *Biophys J.* 90: 514–530.

Thies R. S., Chen T., Davies M. V., Tomkinson K. N., Pearson A. A., Shakey Q. A. y Wolfman N. M. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18: 251-259.

Thomas G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 753–766.

Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J. y Kambadur R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275: 40235–40243.

Trendelenburg A. U.1 Meyer A., Rohner D., Boyle J., Hatakeyama S. y Glass D. J. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296: C1258-C1270.

Velleman S. G. 2007. Muscle development in the embryo and hatchling. *Poultry Sci.* 86:1050–1054.

Wang H., Kubica N., Ellisen L. W., Jefferson L. S. y Kimball S. R. 2006. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J. Biol. Chem.* 281: 39128–39134.

Wolfman N. M., McPherron A. C., Pappano W. N., Davies M. V., Song K., Tomkinson K. N., Wright J. F., Zhao L., Sebald S. M., Greenspan D. S. y Lee S. J. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *PNAS.* 100: 15842–15846.

Xu C., Wu G., Zohar Y. y Du S. J. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 206: 4067-4079.

Yafe A., Shklover J., Shomer P. W., Bengal E. y Fry M. 2008. Differential binding of quadruplex structures of muscle-specific genes regulatory sequences by MyoD, MRF4 and myogenin. *Nucleic Acids Research.* 36: 3916–3925.

Yun K. y Wold B. 1996. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Current Opinion Cell Biol.* 8: 877-889

Zierath J. R., Hawley J. A. 2004. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol.* 2: e348.

Zhiliang G.U., Dahai Z.H.U., Ning L.I., Hui L.I., Xuemei D.E.N.G. y Changxin W.U. 2004. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. *Science in China Ser. C Life Sciences.* 47: 25-30.

Zimmers T. A., Davies M. V., Koniaris L. G., Haynes P., Esquela A. F., Tomkinson K. N., McPherron A. C., Wolfman N. M. y Lee S. J. 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Sc.* 296: 1486-1488.

Zipper H., Bunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32: e103.